



Universitat Autònoma de Barcelona

**APORTACIONS A L'ESTUDI DE LA RELACIÓ
INFLAMACIÓ-TUMORIGÈNESI
EN EL CÒLON.**

TESI DOCTORAL

ELENA EYRE SÁNCHEZ

**Unitat de Fisiologia
Facultat de Veterinària**

Programa de Doctorat d'Immunologia

Bellaterra, Abril 2015

4 Estudis amb mostres humanes

4.1 Materials i mètodes

4.1.1 Caracterització de cèl·lules mononuclears en sang perifèrica

Pacients

En aquest estudi es van utilitzar mostres obtingudes de pacients de l'Hospital Germans Trias i Pujol, de Badalona. Aquestes mostres es van obtenir, previ consentiment informat, a partir de pacients diagnosticats, o bé de UC, o bé de CRC, i avaluats en aquest hospital. L'anàlisi d'aquestes mostres va ser aprovada pel comitè ètic de l'Hospital Germans Trias i Pujol, de Badalona.

Es van establir 5 grups de pacients amb un mínim de $n=12$:

- Grup 1): Controls sans (mostres procedents de donants de sang).
- Grup 2): Pacients de UC en remissió clínica durant un mínim de 6 mesos i una evolució de la malaltia inferior a 5 anys.
- Grup 3): Pacients de UC en remissió clínica durant un mínim de 6 mesos i una evolució de la malaltia superior a 10 anys si es tracta d'una colitis extensa (màxima extensió coneguda durant l'evolució de la malaltia).
- Grup 4): Pacients de UC en brot d'activitat – en aquest grup, la recollida de la mostra es va realitzar abans d'iniciar qualsevol tractament específic del brot –.
- Grup 5): Pacients amb CRC.

Els pacients que complien els criteris d'inclusió es van incorporar a l'estudi independentment del tractament de manteniment utilitzat, si bé aquest va quedar registrat. D'especial importància van ser aquells pacients inclosos al grup 2-3 (en remissió) i al grup 4 (que durant el període d'estudi van presentar un brot). Sempre que va ser possible, es va recollir una nova mostra a aquells pacients del grup 4 que van entrar en remissió clínica.

Criteris d'inclusió: Pacients d'entre 18 i 70 anys amb UC o CRC documentat per criteris clínico-endoscòpics i histològics al moment de l'estudi o al passat.

Criteris d'exclusió: Pacients menors de 18 i majors de 70 anys, amb història de HIV, hepatitis vírica, coagulopatia, ús d'anticoagulants, proctitis documentada o incapacitat per signar el consentiment informat.

Els pacients que complien els criteris d'inclusió es van incorporar a l'estudi independentment del tractament de manteniment utilitzat, si bé aquest va quedar registrat i es van analitzar les possibles diferències entre tractaments.

4. Estudis amb mostres humanes

Malauradament, no es va poder aconseguir cap mostra de pacients que complissin les condicions per incloure'ls al grup 2. Així doncs, es va haver de treballar únicament amb les mostres corresponents als grups 1 (CT), 3, 4 i 5.

Citometria de flux

Es va realitzar l'estudi fenotípic de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica dels pacients per citometria de flux. Es va posar a punt el protocol de marcatge de les cèl·lules utilitzant el panell d'anticossos monoclonals que es mostra a la **Taula 4.1**.

Taula 4.1. Llistat de marcatges realitzats en l'estudi amb mostres de sang humana..

Tipus cel·lular	PBMCs Humanes
Limfòcits T	CD3+
Cèl·lules NK	CD3- CD56+ CD16+
Limfòcits B	CD19+
Limfòcits Th	CD3+ CD4+
Limfòcits Th17	CD4+ CD161+ CD56-
Cèl·lules iNKT	CD3+ CD161+ TCRV α 24+
Limfòcits Treg	CD4+ CD25+ Foxp3+ CD127 ^{low/neg}
Monòcits	CD14+

Es van dispensar 100 μ L de sang perifèrica de cada pacient a tres tubs diferents. Un dels tubs es va utilitzar per a marcatge exclusivament de proteïnes de membrana amb la següent combinació d'anticossos conjugats amb fluorocroms (BDBioscience): CD3e-PerCP, CD161-FITC, CD56-PE, CD14-PECy7, TCRV α 24-APC, CD19-V500, i CD4-V450. (**Taula 4.1**) El segon tub es va utilitzar per a control de l'isotip de CD160, amb tots els anticossos del primer tub llevat l'anticòs anti-CD161-FITC. Després d'incubar 15 minuts els anticossos amb la sang perifèrica, es va afegir FACSLysing 1X (BDBioscience) per eliminar eritròcits, i es va rentar dues vegades afegint PBS 1X i centrifugant 5 minuts a 500·g. El pellet resultant es va resuspendre en 300 μ L de PBS 1X per emmagatzemar en fred fins el moment de la lectura amb el citòmetre de flux.

Pel marcatge de proteïnes intracel·lulars i de membranes del tercer tub es va utilitzar la següent combinació d'anticossos conjugats amb fluorocroms: CD4-V450, CD127-APC, CD25-PE, i FoxP3-FITC. (**Taula 4.1**) El protocol va implicar una incubació inicial de 15 minuts de la sang perifèrica amb els anticossos CD4-V450, CD127-APC, i CD25-PE, i un rentat amb PBS 1X i centrifugació de 5 minuts a 500·g. A continuació, es va fixar i permeabilitzar. Després de tres rentats, es va incubar el pellet amb l'anticòs de FoxP3 durant 30 minuts. Finalment, les cèl·lules obtingudes després de

rentar, es van resuspendre amb 300 µL de PBS 1X per emmagatzemar en fred fins la lectura amb el citòmetre de flux.

Les suspensions marcades es van analitzar amb el citòmetre de flux FACSCanto II, del Servei de Citometria de l'IGTP, i el sistema utilitzat pel processament dels senyals va ser el FACSDiva (que permet una compensació fora-de-línia i la configuració d'escala biexponencial).

4.1.2 Efectes de sobrenedants de monòcits sobre la Funció Epitelial Barrera en cèl·lules Caco-2

En aquest estudi es van utilitzar mostres obtingudes de pacients de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona. Aquestes mostres es van obtenir, previ consentiment informat, a partir d'individus sans o de pacients diagnosticats de UC, i avaluats en aquest hospital. L'anàlisi d'aquestes mostres va ser aprovada pel comitè ètic de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona.

Els PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) aïllats de la sang d'aquests pacients mitjançant centrifugació en gradient amb "*Ficoll-Hypaque*" (Lymphoprep, Axis-Shield PoC As). Les cèl·lules es van rentar dues vegades i es van resuspendre en FCS (Fetal Calf Serum) amb 10% de DMSO, i van ser conservades en nitrògen líquid fins al moment de l'estimulació. Un cop descongelats, els monòcits es van separar de la resta de PBMCs per selecció negativa mitjançant l'ús del "*Human Monocyte Enrichment KIT*" (EasySep Stem Cell). Els monòcits purificats es van cultivar en medi RPMI 1640 (BioWhittaker) + 10% FCS + 2mM de glutamina + 100 U/mL de penicil·lina + 100 µg/mL d'estreptomicina (Biowhitaker), i es van estimular amb agonistes de TLRs. Com agonista de TLR4 es va utilitzar LPS (0.01µg/mL), i com agonista de TLR2, LTA (*lipoteichoic acid*; àcid lipoteitoïc) (1 µg /mL). Després d'una incubació de 24h amb els lligands, es van recollir els corresponents sobrenedants, dels quals es va utilitzar una alíquota per a determinar els nivells de TNFα i la resta es va mantenir a -80°C fins al moment de realitzar l'estudi dels seus efectes sobre la funció barrera.

Per a estudiar la Funció Epitelial de Barrera (FEB) es van cultivar cèl·lules de la línia Caco-2 (HPACC 86010202) damunt filtres semipermeables de policarbonat (Transwells, "BD Falcon Cell Culture Inserts", de BD Biosciences) en medi: DMEM + 10% FBS + 1% NEAA + 2% Pen/Strep (100 U/mL Penicil·lina/ 100mg/mL Estreptomicina) (Gibco, Life Technologies). Un cop els cultius eren confluents es va mesurar la Resistència Elèctrica Transepitelial (TEER) mitjançant un lector de voltatge i resistència ("MILLICELL-ERS"; de MILLIPORE). A partir d'aquí, es van utilitzar els pous en els que el valor de TEER era superior 800 Ω·cm² i en els que hi havia un refús de Lucifer Yellow (LY) (marcador de permeabilitat paracel·lular)

4. Estudis amb mostres humanes

superior al 99%. Aquesta situació s'assolia aproximadament als 20-21 dies post-confluència.

Inicialment es va realitzar un estudi temporal de lectures TEER de les cèl·lules Caco-2 incubades per la part basal amb els sobrenedants procedents de l'estimulació de cèl·lules RAW264.7 amb LPS (*lipopolysaccharide*; lipopolisacàrid) 100ng/mL per tal de dimensionar els efectes esperables dels sobrenedants de monòcits de pacients dels quals es coneixia la concentració de TNF α . Un cop ajustades les condicions, es va escollir una la concentració de TNF α (control positiu de disrupció de barrera) que va ser de 4ng/mL i es van comparar els seus efectes amb els dels sobrenedants dels monòcits estimulats i també amb els efectes ocasionats pel canvi de medi. Els resultats es van representar en funció de la variació del promig de les lectures dels replicats de cada situació experimental en relació amb el promig dels pous control (sense tractar). La **Figura 4.1** il·lustra els detalls d'aquests experiments.

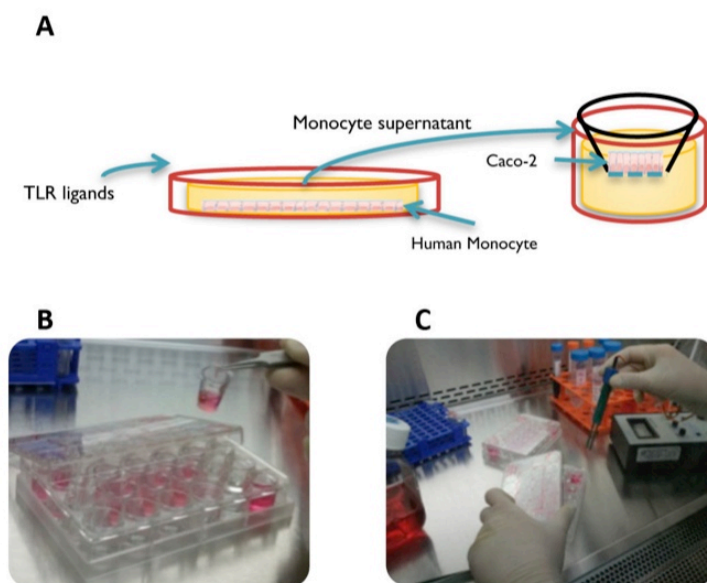


Figura 4.1. Mesura FEB. A: disseny experimental de les incubacions de les Caco-2 amb sobrenedants de monòcits humans estimulats amb lligands de TLRs; B: plaques de *transwells*; C: mesura de la resistència en els cultius dels *transwells* mitjançant el lector de TEER.

4.1.3 Expressió gènica en biòpsies de còlon

En aquest estudi es van utilitzar mostres obtingudes de pacients de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona. Aquestes mostres es van obtenir, previ consentiment informat, a partir d'individus sans o pacients diagnosticats, o bé de UC, o bé de CRC, i avaluats en aquest hospital. L'anàlisi d'aquestes mostres va ser

aprovada pel comitè ètic de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona. Es van incloure: 15 biòpsies de còlon de pacients amb colitis ulcerosa en fase inactiva de més de 10 anys d'evolució obtingudes durant el seguiment rutinari anual; 15 pòlips de còlon de pacients sense signes de malaltia inflamatòria intestinal i amb un diagnòstic histològic que establí que es tractava d'un adenoma vellós o túbulo-vellós i 15 biòpsies de còlon sa (control). La selecció de les biòpsies va estar a càrrec del Servei de Patologia Digestiva de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Aquestes mostres es van utilitzar per la determinació de l'expressió gènica per *microarrays* amb el suport de la Plataforma de Bioinformàtica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Un cop obtingudes les mostres es van criopreservar ràpidament en *RNAlater*/-80°C en tubs *RNasa free*. L'extracció de mRNA de les mostres congelades es va realitzar mitjançant el kit *RNeasy* (QIAGEN, Izasa, Espanya) seguint les instruccions del fabricant. La quantitat i qualitat de l'ARN obtingut es va valorar mitjançant el sistema Experion (Biorad, USA). L'expressió del mRNA es va realitzar amb Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0; d'Affimetrix). L'anàlisi de patrons d'expressió gènica del teixit en els diferents grups es va realitzar mitjançant software específics per l'anàlisi massiu de dades (Affymetrix(R) Expression Console (TM) Software, i R/Bioconductor) i consulta amb bases de dades via informàtica.[25] Aquesta anàlisi es va portar a terme a la plataforma de Genòmica i Transcriptòmica de l'IIB Sant Pau.

4.1.4 Comparacions quantitatives

Les comparacions amb els resultats de les citometries de flux es van fer amb els valors que superaven el test de Grubbs (per eliminar els *outliers*, $\alpha=0.05$), utilitzant el test ANOVA i els post-test de comparacions múltiples Tukey (degut a que teníem un nombre de grups superior a 3, i $n=10-15$). Les comparacions entre els diferents grups es van fer utilitzant el test ANOVA i els post-test de comparacions múltiples Bonferroni (tot i haver més de 2 grups, hi havia algun cas de $n=5$). El test *t- de Student* per a dades no aparellades es va fer servir quan només es feien comparacions entre 2 grups. L'anàlisi de les dades dels *microarrays* van fer servir el paquet de càlculs *Oligo* (pel pre-processament de les dades)[26] i *Limma* (per l'anàlisi d'expressió diferencial entre els grups)[27]; i el genoma de referència utilitzat va ser hg19.

Els valors $P<0.05$ es van considerar estadísticament significatius, i els valors $P=0.05-0.07$ es van considerar que indicaven una tendència.

4.1.5 Ontologia gènica

Per estudiar l'expressió gènica de les biòpsies de colon es va realitzar una anàlisi d'ontologia gènica (*Gene Ontology*; GO).

4. Estudis amb mostres humanes

Tot i que les bases de dades d'expressió gènica han estat àmpliament utilitzades per identificar gens i vies com a marcadors de malalties específiques, per sí soles no poden identificar relacions entre gens dins el sistema d'interès. La identificació d'aquestes relacions requereix integrar la interacció de les xarxes de manera que els canvis dels perfils d'expressió gènica puguin ser plenament entesos. Per això s'han desenvolupat moltes aproximacions informàtiques utilitzant anotacions funcionals, dades d'expressió gènica, entre d'altres. De fet, les tècniques del genoma sencer com l'anàlisi GO han estat útils per estudiar la senyalització en mecanismes patogènics i en la identificació de les vies implicades en una àmplia varietat de fenotips entre els quals IBD, UC, CRC, o CAC.

Les primeres aproximacions informàtiques desenvolupades per generar hipòtesis i analitzar les dades del genoma complert es basaven en les anàlisis d'enriquitment. Aquestes aproximacions es basen en l'anotació extensiva dels gens humans amb descripcions dels aspectes biològics dels gens, tals com la seva funció o la participació en vies metabòliques entre d'altres.

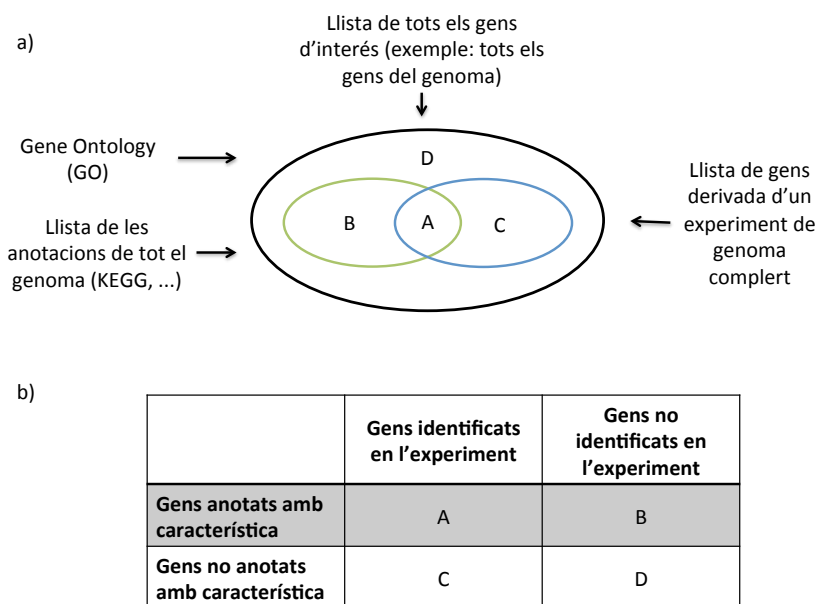


Figura 4.2. Descripció de l'anàlisi d'enriquitment en l'estudi de dades del genoma complert. (a) Esquema general de l'anàlisi. Primer de tot es necessita un model de *background* (exemple: tots els gens del genoma). Llavors, es compara la distribució de les anotacions al model *background* i en el llistat de gens d'interès obtinguts del nostre experiment del genoma complert (exemple: tots els gens per damunt d'un cert nombre de *fold-change* d'un experiment de *microarrays*) utilitzant comparacions estadístiques com el test Fischer. Es fa creant la taula de contingència mostrada en (b) i aplicant algun mètode per corregir test múltiple, com la correcció de Bonferroni.

La idea principal de les anàlisis d'enriquiment és que la llista de gens derivada d'un experiment del genoma complert, pot ser estadísticament interpretat en algunes de les seves propietats biològiques (anotacions) quan es comparen amb un llistat de gens d'interès (normalment el genoma complert). Aquestes propietats biològiques interpretades aportaran informació del què hi ha implicat al fenotip estudiat. **(Figura 4.2)**

Per identificar els aspectes interpretables, l'anàlisi d'enriquiment contrasta les anotacions del genoma complert amb una llista de gens que se suposa que estan relacionats amb la malaltia (derivats d'un experiment de genoma complert). Llavors, es compara el nombre de gens del llistat derivat de l'experiment que té una anotació concreta amb el nombre de gens que s'esperaria si el llistat hagués estat escollit aleatòriament del genoma.

Les anàlisis d'enriquiment es basen en extenses anotacions gèniques d'aspectes biològics. El genoma humà té uns 200.000 gens, per tant, és important que els algorismes que automatitzen aquestes anàlisis utilitzin anotacions úniques i ben identificades. Per això és imprescindible utilitzar un vocabulari controlat per anotar els gens: una llista de termes que descriuen un camp de coneixement. Cada terme del vocabulari està identificat inequívocament, evitant confusions o equivocacions en les anotacions. Mentre que els vocabularis controlats solucionen el problema de l'automatització de les anàlisis d'enriquiment, el seu ús té una limitació: quan es realitza una anàlisi del genoma complert, els *p-values* requerits per una associació estadísticament significativa han de ser molt baixos ja que cal fer servir tests de correcció múltiple, que comporten un problema de manca de potència estadística. Una manera d'esquivar el problema és utilitzar ontologies per anotar gens. Una ontologia informàticament és un tipus de vocabulari controlat definit per un conjunt de termes que descriuen el domini del coneixement (per exemple, els diferents processos biològics en una cèl·lula) i les relacions entre ells. Es pot representar directament per un gràfic acíclic en el qual els nodes (*nodes*) són els termes que pertanyen al domini del coneixement i les vores (*edges*) representen les relacions entre els termes.

Aquesta figura d'ontologies permet la identificació d'associacions no-òbvies mitjançant l'associació d'anotacions utilitzant les relacions entre els termes descrits en la ontologia. La associació de les anotacions al llarg de la ontologia augmenta el poder estadístic de l'anàlisi. L'ontologia més emprada per realitzar anàlisis d'enriquiment de *microarrays* és la *Gene Ontology* (GO) que s'ha utilitzat per anotar gens humans, tant manualment com electrònicament i ha tingut una àmplia cobertura en el genoma.

L'anotació extensiva dels gens humans amb termes GO i el seu ús en anàlisi d'enriquiment amb dades derivades d'experiment del genoma complert, han aportat evidències a la biologia de les malalties. S'han utilitzat les associacions entre

4. Estudis amb mostres humanes

els gens de les llistes dels anàlisis d'enriquiment de *microarrays* com a predictors per identificar nous gens relacionats amb el càncer o per deduir noves anotacions funcionals en gens associats al càncer ja coneguts.

4.2 Resultats

4.2.1 Estudi fenotípic

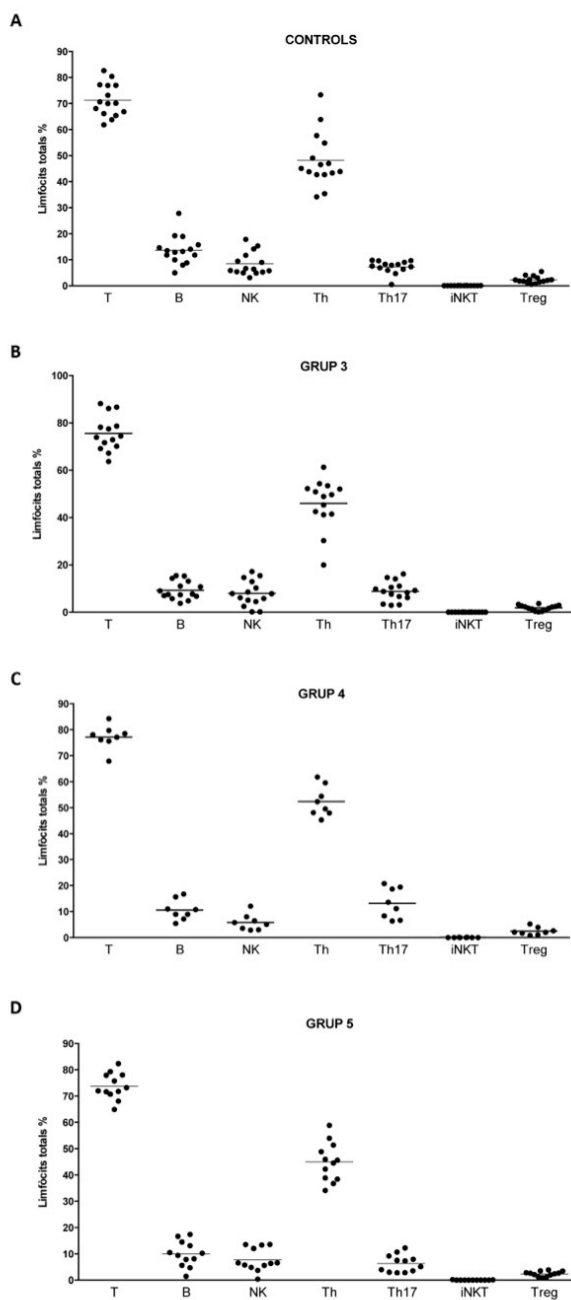


Figura 4.3. Resultats percentuals de les poblacions de cèl·lules per cada grup de pacients. Els grups eren n=12-15, i es van descartar les lectures que no van superar el test de Grubbs ($\alpha=0.05$).

4. Estudis amb mostres humanes

A la **Figura 4.3** es mostren els resultats percentuals de cada població en relació a la població total de limfòcits per a cada grup d'estudi.

A la **Figura 4.4** es mostren percentualment els valors individuals de monòcits en relació a leucòcits totals (**Figura 4.4A**) i en relació a PBMCs (**Figura 4.4B**) en cada grup.

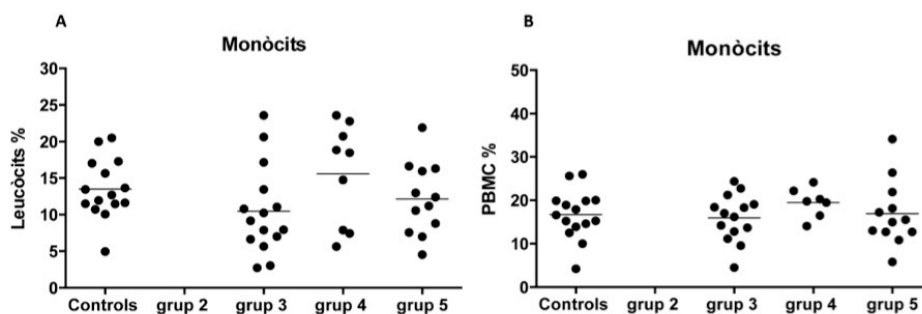


Figura 4.4. Resultats percentuals de les poblacions dels monòcits segons dues poblacions de referències. Els grups eren n=12-15, i es van descartar les lectures que no van superar el test de Grubbs ($\alpha = 0.05$).

En comparar els valors mitjans de cada grup no es van trobar diferències significatives (**Figura 4.5**).

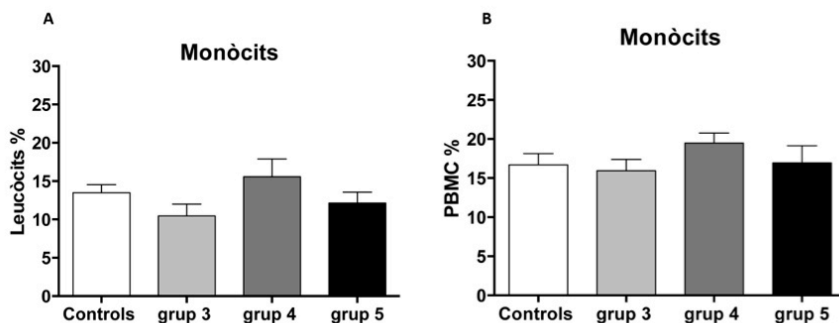


Figura 4.5. Resultats percentuals de les poblacions dels monòcits respecte a leucòcits totals i a PBMC totals. Els grups eren n=12-15, i es va utilitzar el test ANOVA i el post-test Tukey.

Els nivells de monòcits en els grups de pacients de UC en brot (grup 4) eren lleugerament superiors als controls en relació amb el grup control i al grup UC en remissió, però les diferències no van assolir significació estadística. Aquest fet ens va fer descartar el valor d'aquest paràmetre per a la monitorització de pacients. (**Figura 4.6**)

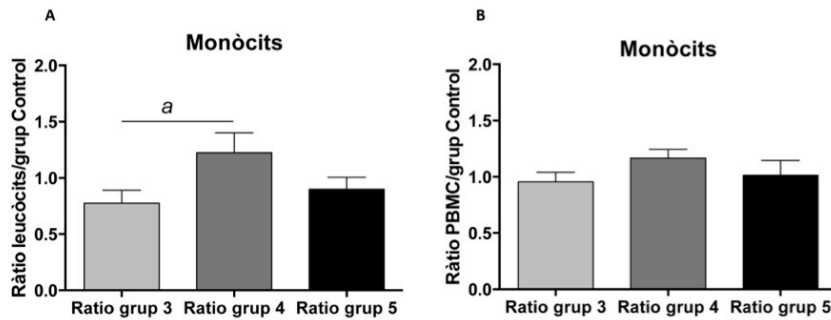


Figura 4.6. Ràtios de les poblacions dels monòcits en relació a leucòcits totals (A) o a PBMCs (B). $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 12-15$, segons el test ANOVA i el post-test Tukey.

A la **Figura 4.7** es mostren els resultats percentuals dels nivells de cada població en els grups dels pacients. Únicament es van observar variacions significatives en la població de limfòcits Th17 (**Figura 4.7F**), amb un augment significatiu del grup 4 (pacients amb UC en brot) en comparació amb la resta de grups. Es van apreciar també lleus variacions no significatives, i que es van recalculer dels ràtios de cada grup de pacients amb respecte al grup control (**Figura 4.8**): tot i així les úniques poblacions amb variacions significatives van ser els limfòcits Th17 (que podrien tenir interès com a paràmetre de monitorització de pacients amb UC).

Resum

- Els monòcits estan lleugerament augmentats en els pacients de UC en brot, però la troballa no és estadísticament significativa i a més ha estat descrita en fenòmens inflamatoris de diversos tipus.
- Els limfòcits Th17 es troben augmentades en pacients amb UC en brot.
- El limitat nombre de pacients i l'elevada variabilitat, sobre tot en poblacions molt minoritàries dificulta extreure conclusions més sòlides però el seguiment de l'evolució de les cèl·lules Th17 és l'únic dels paràmetres estudiats que podria tenir valor com a biomarcador en la monitorització de pacients amb UC.

4. Estudis amb mostres humanes

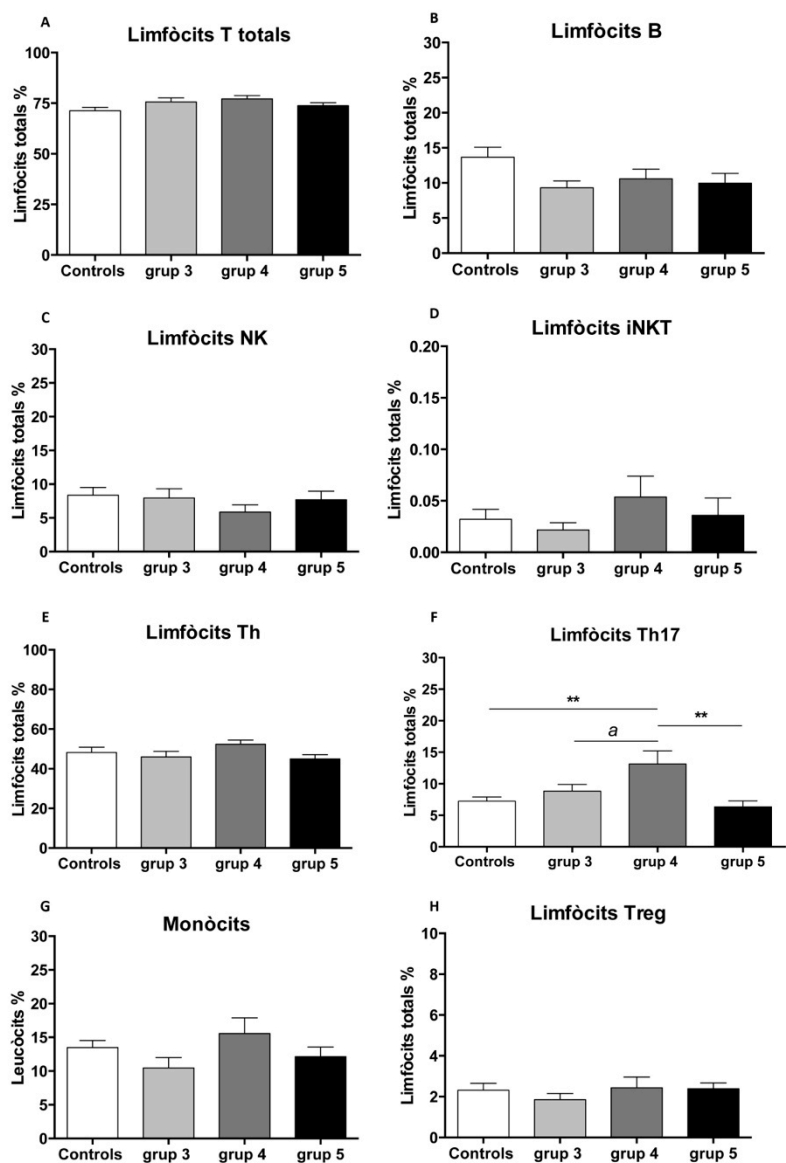


Figura 4.7. Resultats percentuals de les poblacions dels limfòcits i monòcits. Poblacions dels limfòcits i de monòcits, pels diferents grups de pacients corresponents als grups de control, 3, 4 i 5. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 12-15$, segons el test ANOVA i el post-test Tukey.

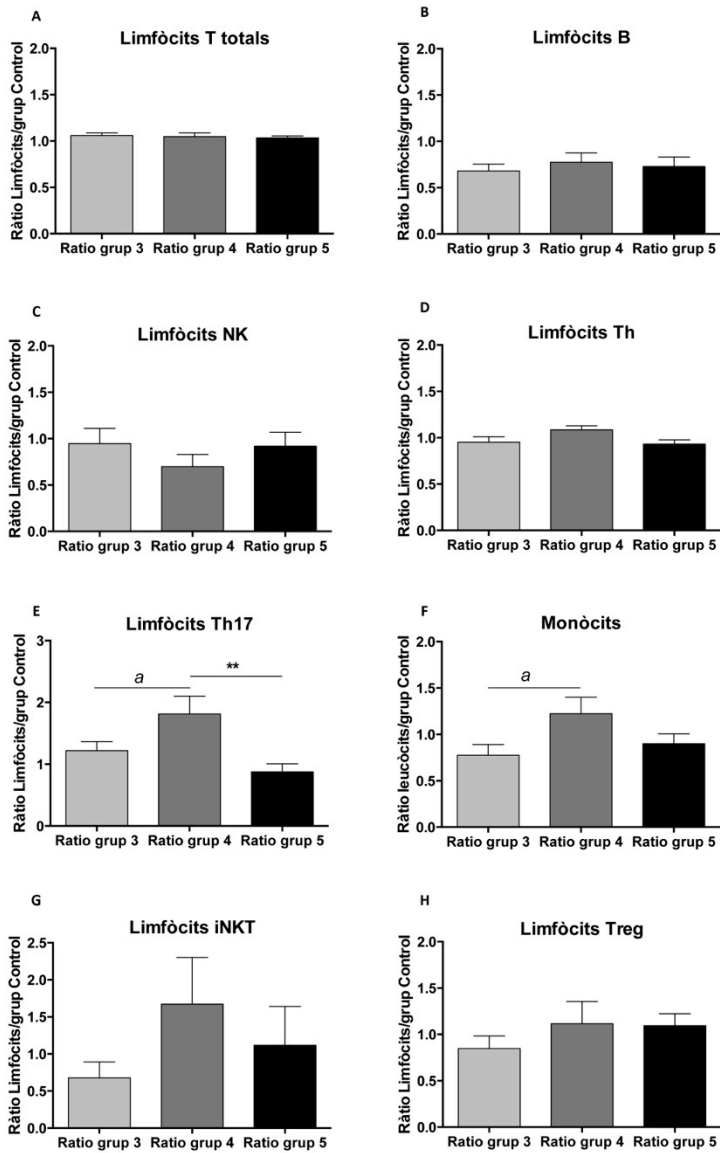


Figura 4.8. Resultats percentuals de les poblacions dels limfòcits i monòcits. Poblacions dels limfòcits i de monòcits, pels grups de control, 3, 4 i 5. $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*) i $P = 0.05-0.07$ tendència (a), i els grups eren $n = 12-15$, segons el test ANOVA i el post-test Tukey.

4.2.2 Estudi sobre la funció barrera

La incubació de cèl·lules Caco-2 (disseny experimental descrit a l'apartat 3 dels *Materials i Mètodes* d'aquest capítol) amb sobrenedants de monòcits va comportar a una disminució en la TEER (**Figura 4.9**). Aquest descens de TEER era més acusat quan els monòcits havien estat estimulats amb lligands TLR2 i TLR4, tant si es tractava de monòcits de pacients de UC com de voluntaris sans.

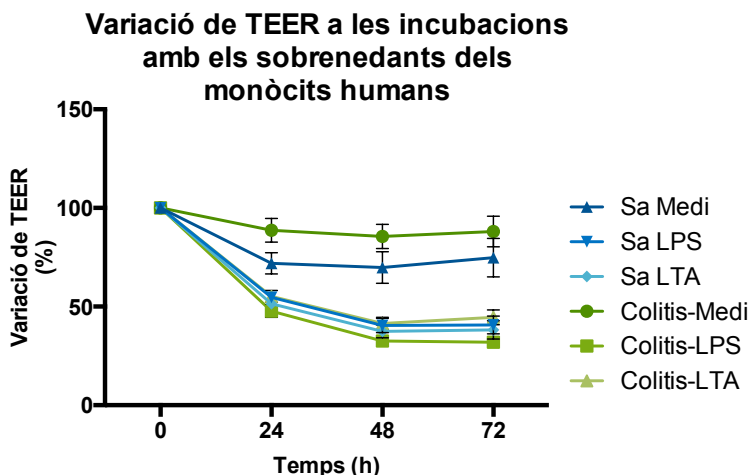


Figura 4.9. Variació de les lectures de TEER. Variació (%) de les lectures de TEER de les incubacions amb sobrenedants de monòcits humans en cultius de cèl·lules Caco2. Els grups eren n=5-25. La variació estadísticament significativa es va analitzar per separat (**Figures 4.10 i 4.11**).

Aquests primers resultats indicarien que tot i que els sobrenedants de monòcits no estimulats dels pacients amb UC i dels controls provoquen efectes diferents, l'estimulació amb lligands TLR uniformitza la resposta.

En analitzar els resultats en funció del temps (**Figura 4.10**), es va observar una disminució estadísticament significativa en tots els casos, més acusada a les 48h (**Figura 4.10B**).

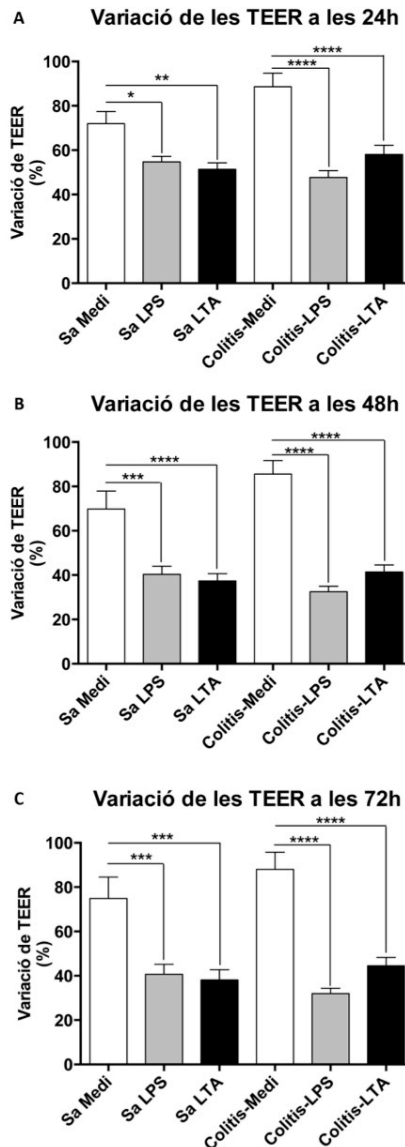


Figura 4.10. Variació de les lectures de TEER segons els diferents temps d'incubació. Variació percentual de les lectures de TEER de les diferents exposicions de les cèl·lules Caco2 a sobredants de monòcits humans. Valors de $P < 0.05$ van ser considerat estadísticament significatius (*), i els grups eren $n = 5-25$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Per valorar els efectes que podrien tenir els sobredants de monòcits estimulats amb lligands de TLRs en comparació amb els de monòcits no estimulats, es van calcular les variacions percentuals de les TEER per cada grup experimental (estimulat/ no estimulat): (**Figura 4.11**). Els resultats van mostrar que la disminució de la TEER era percentualment més important en el cas dels pacients amb UC, cosa

4. Estudis amb mostres humanes

que suggereix que els seus monòcits són més sensibles o responen més enèrgicament a l'estimulació dels receptors TLR, en particular a lligands TLR4 (amb LPS a les 24h i a les 48h; **Figura 4.11A i 4.11B**). Aquesta resposta dels monòcits dels pacients amb UC pot ser parcialment responsable d'un deteriorament més acusat de la funció barrera i podria estar implicada en l'aparició d'un brot.

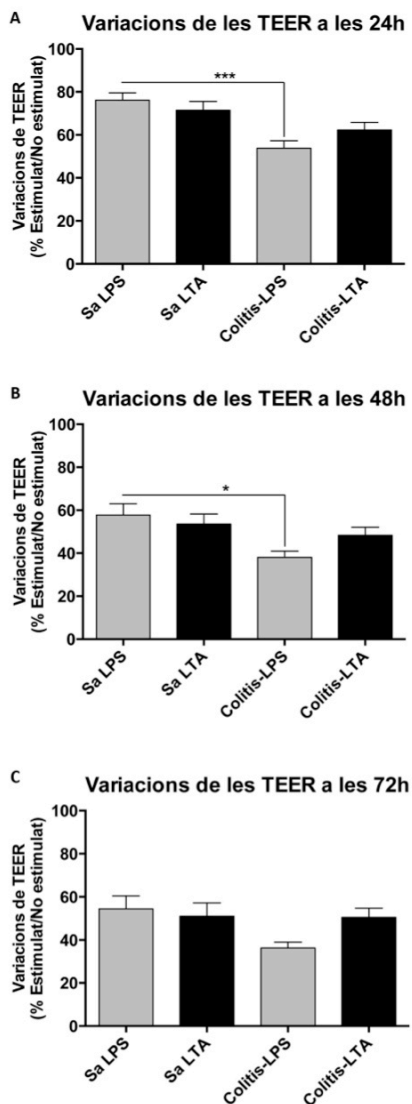


Figura 4.11. Ràtios de la variació de les lectures de TEER segons els diferents temps d'exposició. Ràtios de la variació de les lectures de TEER de les diferents exposicions de les cèl·lules Caco2 a sobredadants de monòcits humans. Valors de $P < 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu (*), i els grups eren $n=5-19$, segons el test ANOVA i el post-test Bonferroni.

Resum

- Els sobrenedants de monòcits no estimulats de pacients amb UC, afecten poc la barrera epitelial intestinal.
- La disminució de la funció barrera estadísticament més significativa es va produir en els casos dels estímuls amb LPS a les 24h i a les 48h.
- En els malalts de UC, els monòcits semblen respondre de manera exacerbada als lligands TLR4, alliberant mediadors que ocasionen un deteriorament més important de la funció barrera en relació amb el que succeeix en individus sans.

4.2.3 Estudi de l'expressió gènica

Es van determinar els nivells d'expressió de 70523 gens sobre *microarrays*. La identificació de patrons d'expressió gènica en cadascun dels grups considerats es va realitzar mitjançant la utilització de *software* específic per a l'anàlisi massiva de dades i la consulta en bases de dades via informàtica. A causa de la informació massiva que s'obté d'aquest tipus d'anàlisi, es van calcular ràtios d'expressió gènica:

- Ade/Col (adenomes/colitis; Ade_Col);
- Ade/Con (adenomes/controls; Ade_Con);
- Col/Con (colitis/controls; Col_Con).

A partir de les ràtios d'expressió gènica, es va realitzar una anàlisi no supervisada per identificar en quins processos GO es trobaven expressions diferencials. (**Figura 4.12**). Aquestes determinacions i anàlisis es van portar a terme amb el suport de la plataforma de Genòmica i Transcriptòmica de l'Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau) [28].

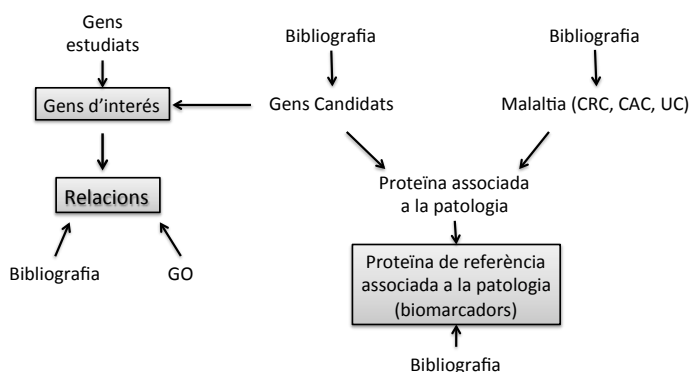


Figura 4.12. Esquema inicial de l'estudi dels resultats dels *arrays*.

Es va obtenir un llistat basat en anotacions classificades per:

1. Comparació entre els teixits:
 - Adenoma vs control
 - Adenoma vs colitis
 - Colitis vs control.
2. Les anotacions estaven *Up/Down-regulated* a les comparacions plantejades.
3. Tipus d'anotació:
 - Procés biològic (BP; *biological process*)
 - Component cel·lular (CC; *cellular component*)
 - Funció molecular (MF; *molecular function*).

4. *P-value* associat:
 - *P-value*= 0,1
 - *P-value*= 0,05
 - *P-value*= 0,01
 - *P-value*= 0,005.
5. Comparació entre bases de dades d'anotacions:
 - GO [21]
 - KEGG [22]
 - Reactome [29].

Selecció del *p-value*

Donat l'elevat nombre de gens i anotacions, cal acotar el valor de *P* de forma que s'obtingui un nombre abordable de conceptes a analitzar. La **Figura 4.13** mostra el nombre termes GO en funció de cadascuna de les comparacions i per cada nivell de significació (*P*).

Acotant el valor de $P < 0.05$ es va aconseguir restringir el volum d'anotacions de manera que fos assumible la seva anàlisi.

Va destacar l'absència d'anotacions significatives quan es comparaven els grups Colitis vs Control, tant *up* com *down-regulated*. En el cas del grup Col_Con_Down només hi ha termes significatius a GO-CC (grup Gene Ontology – Cellular Component). Possiblement, el motiu de l'escassetat de diferències es deu al fet que les mostres del grup colitis provenien de pacients en remissió, mantinguda generalment gràcies a tractaments farmacològics.

La selecció es va basar en: la disponibilitat d'anotacions associades a processos biològics, i la base de dades més actualitzada en el moment de l'anàlisi (Juliol del 2014), que va ser AmiGO2, basada en anotacions GO [21].

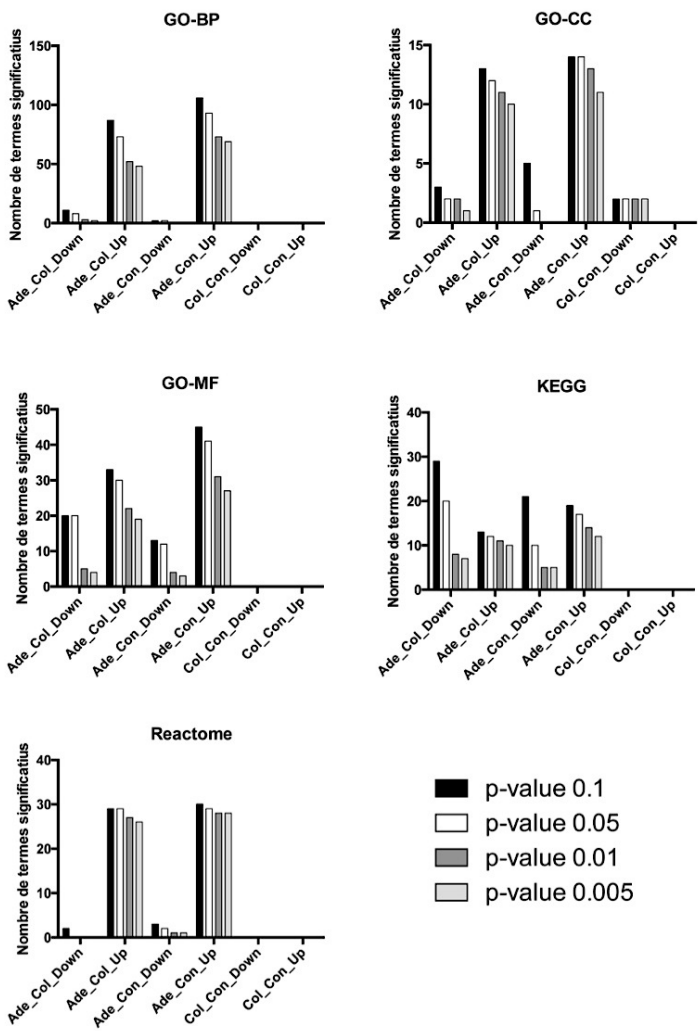


Figura 4.13. Representació de les distribucions d'anotacions segons els grups de classificació i els p-values. Es van obtenir representacions segons la base de dades consultada (GO, KEGG o Reactome), i el tipus d'anotació (procés biològic o BP, component cel·lular o CC, i funció molecular o MF).

Relacions de les anotacions

Es va definir una recerca supervisada d'anotacions, per poder treballar amb la informació biològica rellevant pel tipus de patologies que estàvem estudiant:

1. mitjançant paraules clau presents a les anotacions significatives dels processos biològics GO obtinguts:
 - 1.1. Relacionades amb la inflamació: *inflammation, permeability, innate immunity, adaptive immunity*;
 - 1.2. Relacionades amb la tumorigènesi: *angiogenesis, hypoxia, adhesion, proliferation, apoptosis*;
2. mitjançant l'anàlisi de les relacions dels processos GO relacionats amb: [30]
 - 2.1. processos cancerígens utilitzant les coincidències entre els grups:
 - 2.1.1. Ade_Col_Down vs Ade_Con_Down
 - 2.1.2. Ade_Col_Up vs Ade_Con_Up
 - 2.2. processos inflamatoris utilitzant les coincidències entre els grups:
 - 2.2.1. Ade_Col_Down vs Col_Con_Up&Down (per no tenir anotacions significatives dels processos biològics GO grups Col_Con_Up o Col_Con_Down, es van utilitzar les dades d'origen encara que no fossin significatives, que no distingien entre *up* i *down-regulated*, per poder analitzar les coincidències)
 - 2.2.2. Ade_Col_Up vs Col_Con_Up&Down
 - 2.3. processos associats amb la proliferació cel·lular que podrien veure's afectats en situacions d'inflamació crònica, utilitzant les coincidències entre els grups:
 - 2.3.1. Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down
 - 2.3.2. Ade_Con_Up vs Col_Con_Up&Down

Resultats de les paraules claus

La recerca d'anotacions en els resultats, segons paraules clau, es va realitzar utilitzant com a referència els processos biològics GO (GO-BP) que va presentar la base de dades QuickGO [31], i posteriorment es buscaven en els resultats de l'anàlisi massiva de dades realitzat. Seguidament, es consultava en bases de dades especialitzades la identitat dels gens alterats en el nostre estudi que es troben implicats en aquests processos [32].

A la recerca amb paraules clau relacionades amb la **inflamació** només es van trobar coincidències amb el grup Col_Con_Up&Down, però destaca la quantitat de vegades que apareixen els gens *fcer1g* i *a2m*. (**Taula 4.9**)

4. Estudis amb mostres humanes

Taula 4.9. Resultats de la recerca amb paraules clau relacionades amb la inflamació.[35] [36]

Paraula clau	Nombre d'entrades GO associats a la paraula clau en la base de dades consultada	Processos BP-GO coincidents amb els microarrays amb gens diferentment expressats			
		Terme GO	Nom del procés	Grup	Gens afectats
Inflammation	21	GO:0006954	Resposta inflamatòria	Col_Con_Up&Down	<i>A2m, fcer1g, cfh</i>
Inflammation	21	GO:0031960	Resposta als corticoesteroides	Col_Con_Up&Down	<i>A2m</i>
Inflammation	21	GO:0002526	Resposta inflamatòria aguda	Col_Con_Up&Down	<i>A2m, fcer1g, cfh</i>
Permeability	33	-	-	-	-
Innate immunity	110	GO:0045087	Resposta immune innata	Col_Con_Up&Down	<i>A2m, cfh</i>
Innate immunity	110	GO:0019724	Immunitat mediada per cèl·lules B	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Innate immunity	110	GO:0002443	Immunitat mediada per leucocits	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Innate immunity	110	GO:0045088	Regulació de la resposta immune innata	Col_Con_Up&Down	<i>A2m</i>
Adaptive immunity	89	GO:0002250	Resposta immune adaptativa	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Adaptive immunity	89	GO:0002821	Regulació positiva de la resposta immune adaptativa	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Adaptive immunity	89	GO:0019724	Immunitat mediada per cèl·lules B	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Adaptive immunity	89	GO:0002443	Immunitat mediada per leucocits	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Adaptive immunity	89	GO:0045087	Resposta immune innata	Col_Con_Up&Down	<i>A2m, cfh</i>

A la recerca amb paraules clau relacionades amb la **tumorigènesi** a més de trobar coincidències amb el grup Col_Con_Up&Down, també es van trobar amb el grup Ade_Col_Up en el cas de la paraula clau “adhesió”. Els gens que apareixien de manera més freqüent van ser *itga8* i *fcer1g*. (**Taula 4.10**)

Aquesta recerca per paraules clau suggeriria l'interès d'analitzar les funcions dels gens d'aquesta recerca, especialment *fcer1g*, *a2m* i *itga8*.

Taula 4.10. Resultats de la recerca amb paraules clau relacionades amb la tumorigènesi.[35] [36]

Paraula clau	Nombre d'entrades GO associats a la paraula clau en la base de dades consultada	Processos BP-GO coincidents amb els microarrays amb gens diferentment expressats			
		Terme GO	Nom del procés	Grup	Gens afectats
Angiogenesis	21	-	-	-	-
Hypoxia	18	-	-	-	-
Adhesion	242	GO:0007155	Adhesió cel·lular	Col_Con_Up&Down	<i>Itga8, col14a1, flrt3, cxcl12, nrp1</i>
Adhesion	242	GO:0007160	Adhesió matriu-cèl·lula	Col_Con_Up&Down	<i>Itga8</i>
Adhesion	242	GO:0031589	Adhesió substrat-cèl·lula	Col_Con_Up&Down	<i>Itga8</i>
Adhesion	242	GO:0000070	Segregació mitòtica de la cromàtida germana	Ade_Col_Up	<i>Smc2, ncapg, zw10, ndc80, ncapd3, seh1, ncaph, cdc23, mad211, dsccl1</i>
Proliferation	458	-	-	-	-
Apoptosis	350	GO:0042981	Regulació del procés d'apoptosis	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>
Apoptosis	350	GO:0043066	Regulació negativa del procés d'apoptosis	Col_Con_Up&Down	<i>Fcer1g</i>

Relacions dels GO-BP

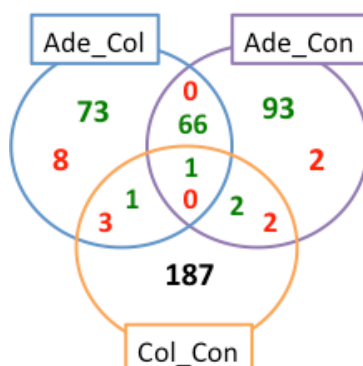


Figura 4.14. Nombre de processos GO-BP, i les relacions entre els grups de treball. En vermell es representen el nombre de processos *down-regulated*, i en verd es representen el nombre de processos *up-regulated*. Tot i no distingir entre *up* o *down-regulated* en el grup Col_Con, les coincidències es representen en verd o vermell segons la coincidència en els grups Ade_Col o Ade_Con.

Per trobar les anotacions dels GO-BP relacionades amb la tumorigènesi, o amb la inflamació, o amb la inflamació relacionada amb tumorigènesi, es van realitzar encreuaments de les dades per trobar les coincidències. (**Figura 4.14**)

Processos relacionats amb tumorigènesi:

A la comparació dels grups Ade_Col_Down vs Ade_Con_Down no es va trobar cap coincidència, cosa que indicava que no constava als resultats cap procés biològic *down-regulated* relacionat amb proliferació tumoral en els grups de l'estudi.

En canvi, es van obtenir 66 coincidències en la comparació dels grups Ade_Col_Up vs Ade_Con_Up. I d'aquestes coincidències, es van seleccionar els GO-BP que podrien ser d'interès en el nostre estudi, i aquells processos que presentessin un *p-value* ajustat inferior a 0,05. Es va donar el cas que els termes GO:0006974 i el GO:0034984 eren sinònims (procés definit de la mateixa manera però classificat de manera diferent), però no es van unificar perquè no contenien la mateixa informació (el *P-value* i el llistat de gens afectats segons un procés o l'altre era diferent). (**Taula 4.11**)

Taula 4.11. Llistat de processos GO-BP seleccionats en la comparació entre Ade_Col_Up amb Ade_Con_Up, pel seu interès en el nostre estudi.

Terme	Nom GO	Nombre de gens amb l'expressió alterada	<i>P-value</i> ajustat
GO:0006281	<i>DNA repair</i>	85	1,43E-05
GO:0006974	<i>cellular response to DNA damage stimulus</i>	96	6,22E-04
GO:0034984	<i>cellular response to DNA damage stimulus</i>	93	2,96E-05
GO:0007049	<i>cell cycle</i>	169	1,80E-02
GO:0000278	<i>mitotic cell cycle</i>	101	3,72E-03

En examinar aquests processos GO, es va trobar que tots coincidien en un grup de gens alterats. (**Figura 4.15 i Taula 4.12**)

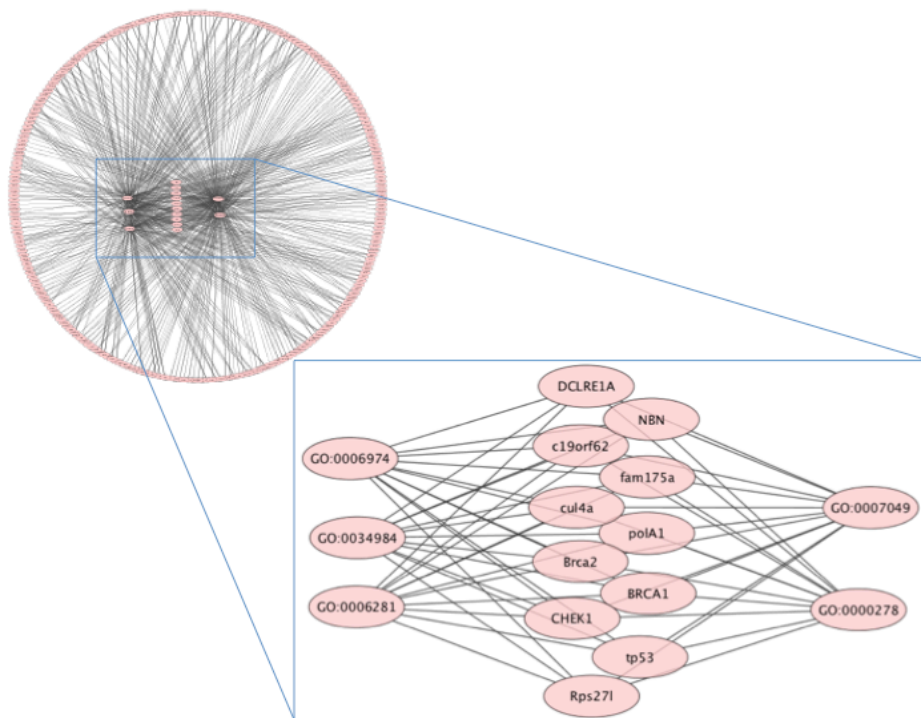


Figura 4.15. Representació mitjançant el software Cytoscape de les comparacions entre els processos GO i els seus gens associats. Els gens que consten a tots cinc processos GO, estan situats a la zona central de la figura.

Taula 4.12. Gens que apareixien en tots els GO-BP seleccionats relacionats amb la tumorigènesi.

Identificador	Nom	Localitzador
Nbn	<i>Nibrin</i>	NM_002485
Brca2	<i>Breast cancer 2, early onset</i>	NM_000059
C19orf62	<i>Chromosome 19 open reading frame 62</i>	NM_001033549
Tp53	<i>Tumor protein p53</i>	NM_000546
Chek1	<i>Chk1 checkpoint homolog (S. Pombe)</i>	NM_001114121
Rps27l	<i>Ribosomal protein S27-like</i>	NM_015920
Cul4a	<i>Cullin 4A</i>	NM_001008895
polA1	<i>Polymerase (dna directed), alpha 1, catalytic subunit</i>	NM_016937
Fam175a	<i>Family with sequence similarity 175, member a</i>	NM_139076
Dclre1a	<i>Dna cross-link repair 1a (pso2 homolog, S. Cerevisiae)</i>	NM_014881
Brca1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>	NM_007294

Inflamació:

A la comparació dels grups Ade_Col_Down vs Col_Con_Up&Down es van trobar 3 coincidències en GO-BP (**Taula 4.13**) però que no contenien cap gen en comú. És possible que ens apareguin en aquesta comparació per estar relacionats amb els processos de regeneració tissular associats a la colitis, present als dos grups.

Taula 4.13. Llistat de processos GO-BP seleccionats en la comparació entre Ade_Col_Down amb Col_Con_Up&Down.

Terme	Nom GO	Nombre de gens amb l'expressió alterada	P-value ajustat
GO:0006629	<i>lipid metabolic process</i>	100	0.000463031
GO:0009100	<i>glycoprotein metabolic process</i>	30	0.0169017
GO:0006468	<i>protein phosphorylation</i>	88	0.0115224

En canvi, en comparar Ade_Col_Up vs Col_Con_Up&Down només es va trobar un GO coincident. (**Taula 4.14**)

Taula 4.14. Procés GO-BP seleccionat en la comparació entre Ade_Col_Up amb Col_Con_Up&Down.

Terme	Nom GO	Nombre de gens amb l'expressió alterada	P-value ajustat
GO:0009308	<i>amine metabolic process</i>	85	9,35E+02

No es va poder identificar gens concrets que poguessin estar relacionats amb la inflamació.

Inflamació relacionada amb tumorigènesi:

Es van comparar també els grups Ade_Con i Col_Con_Up&Down perquè la inflamació podia aportar estímuls iniciadors de tumors i potenciadors de tumors i mediadors amb els quals es generaria un microambient favorable pel tumor.

La comparació entre els grups Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down va resultar en dues coincidències (**Taula 4.15**) però que contenien gairebé el mateix: coincidien en 44 gens. (**Figura 4.16 i Taula 4.16**)

Taula 4.15. Procés GO-BP seleccionat en la comparació entre Ade_Con_Down amb Col_Con_Up&Down.

Terme	Nom GO	Nombre de gens amb l'expressió alterada	P-value ajustat
GO:0030029	<i>actin filament-based process</i>	46	0.0340437
GO:0030036	<i>actin cytoskeleton organization</i>	44	0.0340437

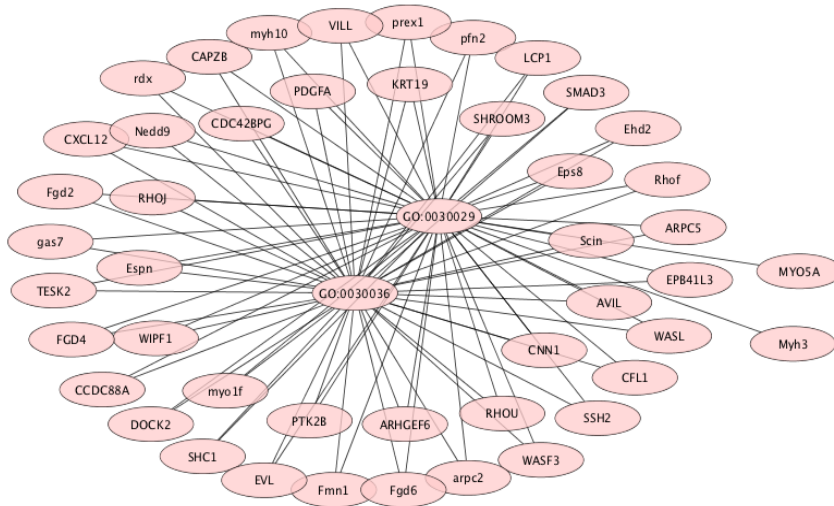


Figura 4.16. Representació mitjançant el software Cytoscape de les comparacions entre els processos GO i els seus gens associats. Els gens que no coincideixen als dos processos GO, estan situats a l'extrem dret de la figura.

4. Estudis amb mostres humanes

Taula 4.16. Gens que apareixien en tots els GO-BP seleccionats que podrien relacionar la inflamació amb la tumorigènesi.

Identificador	Nom	Localitzador
<i>Prex1</i>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate-Dependent Rac Exchange Factor 1	NM_020820
<i>Krt19</i>	Keratin 19	NM_002276
<i>Lcp1</i>	Lymphocyte Cytosolic Protein 1 (L-Plastin)	NM_002298
<i>Rhof</i>	Ras Homolog Gene Family, Member F (In Filopodia)	NM_019034
<i>Ptk2b</i>	PTK2B Protein Tyrosine Kinase 2 Beta	NM_004103
<i>Smad3</i>	SMAD Family Member 3	NM_001145102
<i>Arpc5</i>	Actin Related Protein 2/3 Complex, Subunit 5, 16kda	NM_005717
<i>Vill</i>	Villin-Like	NM_015873
<i>Epb4113</i>	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-Like 3	NM_012307
<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12 (Stromal Cell-Derived Factor 1)	NM_000609
<i>Nedd9</i>	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9	NM_006403
<i>Cfl1</i>	Cofilin 1 (Non-Muscle)	NM_005507
<i>Ehd2</i>	EH-Domain Containing 2	NM_014601
<i>Rhou</i>	Ras Homolog Gene Family, Member U	NM_021205
<i>Fmn1</i>	Formin 1	NM_001103184
<i>Cnn1</i>	Calponin 1, Basic, Smooth Muscle	NM_001299
<i>Rdx</i>	Radixin	NM_002906
<i>Espin</i>	Espin	NM_031475
<i>Fgd6</i>	FYVE, Rhogef And PH Domain Containing 6	NM_018351
<i>Gas7</i>	Growth Arrest-Specific 7	NM_201433
<i>Wasl</i>	Wiskott-Aldrich Syndrome-Like	NM_003941
<i>Dock2</i>	Dedicator Of Cytokinesis 2	NM_004946
<i>Arpc2</i>	Actin Related Protein 2/3 Complex, Subunit 2, 34kda	NM_005731
<i>Shroom3</i>	Shroom Family Member 3	NM_020859
<i>Arhgef6</i>	Rac/Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 6	NM_004840
<i>Cdc42bpg</i>	CDC42 Binding Protein Kinase Gamma (DMPK-Like)	NM_017525
<i>Myo1f</i>	Myosin IF	NM_012335
<i>Ssh2</i>	Slingshot Homolog 2 (Drosophila)	NM_033389
<i>Ccdc88a</i>	Coiled-Coil Domain Containing 88A	NM_001135597
<i>Avil</i>	Advillin	NM_006576
<i>Wipf1</i>	WAS/WASL Interacting Protein Family, Member 1	NM_001077269
<i>Rhoj</i>	Ras Homolog Gene Family, Member J	NM_020663
<i>Pfn2</i>	Profilin 2	NM_002628
<i>Eps8</i>	Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 8	NM_004447
<i>Pdgfra</i>	Platelet-Derived Growth Factor Alpha Polypeptide	NM_002607
<i>Myh10</i>	Myosin, Heavy Chain 10, Non-Muscle	NM_005964
<i>Fgd2</i>	FYVE, Rhogef And PH Domain Containing 2	NM_173558
<i>Shc1</i>	SHC (Src Homology 2 Domain Containing) Transforming Protein 1	NM_001130040
<i>Evl</i>	Enah/Vasp-Like	NM_016337
<i>Fgd4</i>	FYVE, Rhogef And PH Domain Containing 4	NM_139241
<i>Scin</i>	Scinderin	NM_001112706
<i>Tesk2</i>	Testis-Specific Kinase 2	NM_007170
<i>Capzb</i>	Capping Protein (Actin Filament) Muscle Z-Line, Beta	NM_004930
<i>Wasf3</i>	WAS Protein Family, Member 3	NM_006646

La comparació entre els grups Ade_Con_Up vs Col_Con_Up&Down va resultar en dues coincidències. (Taula 4.17)

Taula 4.17. Procés GO-BP seleccionat en la comparació entre Ade_Con_Up amb Col_Con_Up&Down.

Terme	Nom GO	Nombre de gens amb l'expressió alterada	P-value ajustat
GO:0051716	cellular response to stimulus	151	1,65E+03
GO:0009308	amine metabolic process	93	3,46E+02

En examinar aquests processos GO, es va trobar que tots coincidien en un grup de 4 gens alterats (ATF4C estaria codificada pel mateix gen *atf4*). (Figura 4.17 i Taula 4.18)

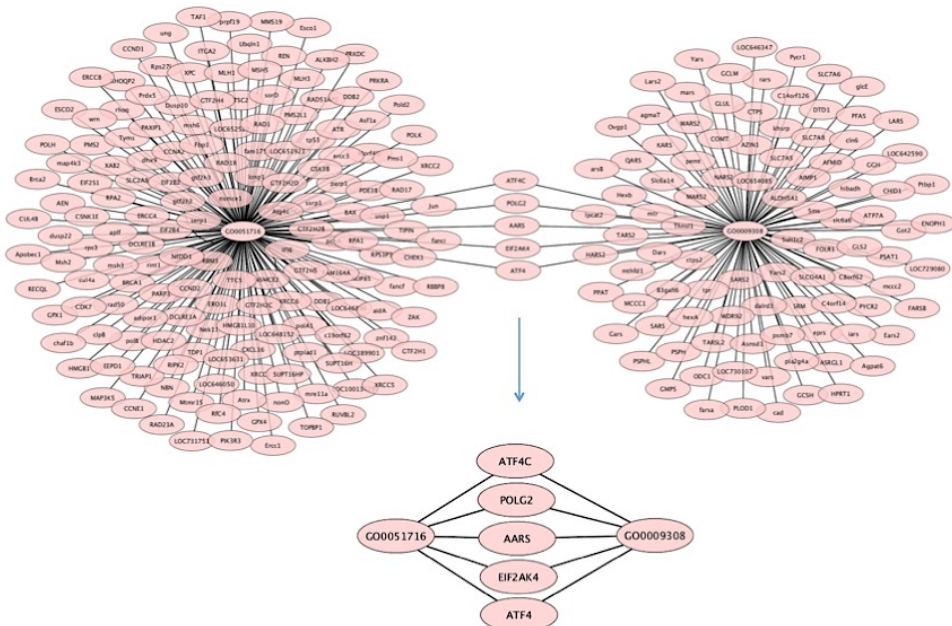


Figura 4.17. Representació mitjançant el software Cytoscape de les comparacions entre els processos GO i els seus gens associats. Els gens que consten als dos processos GO, estan situats a la zona central de la figura.

Taula 4.18. Gens que apareixen en tots els GO-BP seleccionats relacionats amb la inflamació.

Identificador	Nom	Localitzador
<i>Eif2ak4</i>	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	NM_001013703
<i>Polg2</i>	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit	NM_007215
<i>Atf4</i>	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67); activating transcription factor 4C	NM_182810
<i>Aars</i>	alanyl-tRNA synthetase	NM_001605

Resum

L'anàlisi massiva de RNA de les biòpsies de pacients amb adenomes colorectals, colitis o individus sans i les consultes de bases de dades especialitzades, ens van permetre obtenir els següents resultats:

- L'anàlisi dels processos GO-BP significatius, mitjançant paraules clau relacionades amb la inflamació, va mostrar una afectació dels gens *a2m*, *fcer1g*, i *cfh* en la majoria dels GO-BP analitzats.
- I la mateixa anàlisi mitjançant paraules clau relacionades amb la tumorigènesi, es va observar una alteració dels gens: *itga8*, *col14a1*, *flrt3*, *cxcl12*, *nrp1*, *smc2*, *ncapg*, *zw10*, *ndc80*, *ncapd3*, *seh1l*, *ncaph*, *cdc23*, *mad2l1*, *dsccl1*, i *fcer1g*.
- A través de comparacions entre els grups de processos GO-BP es van observar relacions significatives entre processos cancerígens i els GO-BP regulats positivament associats a: la reparació de l'ADN, la resposta cel·lular a l'estímul de dany a l'ADN i el cicle cel·lular. També es va trobar la coincidència de la participació en tots aquests processos GO-BP dels gens *Nbn*, *Brca2*, *C19orf62*, *Tp53*, *Chek1*, *Rps27l*, *Cul4a*, *polA1*, *Fam175a*, *Dclre1a*, i *Brca1*.
- No es van obtenir resultats en la comparació entre processos GO-BP regulats negativament en els processos cancerígens.
- En les comparacions entre els grups de processos GO-BP es va observar una relació significativa entre processos inflamatoris i els GO-BP regulats positivament que es troben associats al processament metabòlic d'amines.
- A través de comparacions entre els grups de processos GO-BP es va observar relacions significatives entre processos inflamatoris i els GO-BP regulats negativament que es troben associats a: processament metabòlic dels lípids, el processament metabòlic de les glicoproteïnes, i la fosforilació proteica. En mirar les possibles coincidències no es va obtenir cap resultat.
- També es va analitzar quins processos GO-BP, podrien relacionar la proliferació cel·lular i la inflamació.
 - Els processos regulats positivament que van destacar en la comparació van ser: la resposta cel·lular a estímul, i el processament metabòlic d'amines. I en comparar-los, es va observar que hi havia gens que participaven en ambdós processos: *eif2ak4*, *polg2*, *atf4* i *aars*.
 - Els processos regulats negativament que van destacar en la comparació van ser: el procés basat en filament d'actina, i l'organització del citosquelet d'actina. I la seva comparació va mostrar que hi havia 44 gens (**Taula 8**) que participen en els dos processos (tots els associats al procés d'organització del citosquelet d'actina).

Referències Bibliogràfiques

- [1] H. S. Cooper, S. N. Murthy, R. S. Shah, et al., "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." *Lab. Invest.*, vol. 69, no. 2, pp. 238–49, Aug. 1993.
- [2] E. Talero, S. Sánchez-Fidalgo, I. Villegas, et al., "Role of different inflammatory and tumor biomarkers in the development of ulcerative colitis-associated carcinogenesis." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 17, no. 3, pp. 696–710, Mar. 2011.
- [3] E. A. McLellan, A. Medline, and R. P. Bird, "Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions." *Cancer Res.*, vol. 51, no. 19, pp. 5270–4, Oct. 1991.
- [4] I. Thorup, "Histomorphological and immunohistochemical characterization of colonic aberrant crypt foci in rats: relationship to growth factor expression." *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 3, pp. 465–72, Mar. 1997.
- [5] D. A. Delker, Q. S. Wang, a Papanikolaou, et al., "Quantitative assessment of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in inbred mice." *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 65, no. 3, pp. 141–9, Feb. 1999.
- [6] H. S. Cooper, S. Murthy, K. Kido, et al., "Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation." *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 4, pp. 757–68, Apr. 2000.
- [7] R. S. Ā, H. Kohno, S. Sugie, et al., "Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice." *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 1, pp. 162–9, Jan. 2006.
- [8] J. E. Paulsen, H. Knutsen, H. B. Ølstørn, et al., "Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated A/J mice." *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 3, pp. 540–6, Feb. 2006.
- [9] B. P. Lewis, I. Shih, M. W. Jones-Rhoades, et al., "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell*, vol. 115, no. 7, pp. 787–98, Dec. 2003.
- [10] F. Wang, S. C. C. Wong, L. W. C. Chan, et al., "Multiple Regression Analysis of mRNA-miRNA Associations in Colorectal Cancer Pathway." *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 676724, Jan. 2014.
- [11] "TargetScanMouse 6.2." Available: http://www.targetscan.org/mmu_61/
- [12] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, et al., "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, Jan. 2009.
- [13] "microRNA.org." Available: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>

Resultats

- [14] D. Betel, A. Koppal, P. Agius, et al., "Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites." *Genome Biol.*, vol. 11, no. 8, p. R90, Jan. 2010.
- [15] "PicTar." Available: http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/new_PicTar_mouse.cgi
- [16] "DIANA LAB - DNA Intelligent Analysis - microT v3.0 Web Server." Available: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>
- [17] M. Maragkakis, T. Vergoulis, P. Alexiou, et al., "DIANA-microT Web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association." *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. Web Server issue, pp. W145–8, Jul. 2011.
- [18] "Microcosm Targets." Available: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>
- [19] "miRDB - MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database." Available: <http://mirdb.org/miRDB/>
- [20] "Home - PubMed - NCBI." Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- [21] "Gene Ontology Consortium | Gene Ontology Consortium." Available: <http://geneontology.org/>
- [22] "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." Available: <http://www.genome.jp/kegg/>
- [23] "PANTHER - Gene List Analysis." Available: <http://www.pantherdb.org/>
- [24] O. Slaby, M. Svoboda, J. Michalek, et al., "MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application." *Mol. Cancer*, vol. 8, p. 102, Jan. 2009.
- [25] R. C. Gentleman, V. J. Carey, D. M. Bates, et al., "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." *Genome Biol.*, vol. 5, no. 10, p. R80, Jan. 2004.
- [26] B. S. Carvalho and R. A. Irizarry, "A framework for oligonucleotide microarray preprocessing." *Bioinformatics*, vol. 26, no. 19, pp. 2363–7, Oct. 2010.
- [27] G. Smyth, "limma: Linear Models for Microarray Data" in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, no. 2005, 2005, pp. 397–420.
- [28] "IIB Sant Pau | Instituto de Investigación Biomédica: Plataforma de genómica y transcriptómica." Available: <http://www.iibsantpau.cat/portal/es/iib/13286>
- [29] "Reactome Pathway Database." Available: <http://www.reactome.org/>
- [30] "Cytoscape: An Open Source Platform for Complex Network Analysis and Visualization." Available: <http://www.cytoscape.org/index.html>
- [31] "QuickGO." Available: <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>
- [32] "DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis." Available: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>

5.1 Estudis en el model murí

5.1.1 Evolució clínica, canvis histopatològics i d'expressió gènica

Els nostres resultats van confirmar l'efecte potenciador de la inflamació crònica sobre el procés tumorigènic, escurçant l'evolució i agreujant notablement les lesions a la mucosa del còlon. La major part dels canvis observats correlacionen directament l'augment del nombre de cicles de DSS amb una inflamació més severa i una major proliferació cel·lular. Com en altres estudis [1], la regió que es va veure més afectada va ser el còlon distal. El subministrament cíclic de DSS va produir reduccions transitòries en els pesos dels ratolins que se superaven quan es retirava el DSS, tornant a un augment progressiu de pes. En el model murí AOM/DSS, la monitorització a través de criteris clínics (pes corporal i determinació del DAI) permet un seguiment longitudinal i podria reproduir l'evolució clínica d'humans amb colitis no tractades.

Tot i que el desenvolupament de càncer és factible subministrant únicament cicles repetitius de DSS en l'aigua de beguda, l'exposició requerida és molt llarga i la incidència i/o multiplicitat dels tumors induïts és relativament baixa pel fet que la capacitat del DSS de provocar mutacions és molt limitada, tot i el seu efecte inflamatori [2]. El model AOM/DSS escollit per a valorar la contribució de la inflamació al desenvolupament del càncer és adient perquè permet reproduir els efectes que provoquen els brots inflamatoris sobre la progressió de lesions causades per l'administració d'un agent mutagen com l'AOM [3]. Donat que actualment els pacients de colitis reben sistemàticament tractament pal·liatiu, aquest model murí podria ser útil per contrastar el valor preventiu de mesures dietètiques o farmacològiques per reduir el risc de desenvolupar CRC i aportar dades interessants en relació als mecanismes que justifiquen els seus efectes, així com per aportar informació orientativa respecte de possibles biomarcadors que permetin identificar de manera precoç una evolució cap a processos cancerosos.

L'augment de la multiplicitat tumoral, del pes de la melsa, del ràtio pes/longitud, i de la puntuació final de la valoració histològica del còlon als grups AD, van evidenciar el marcat efecte potenciador de la inflamació sobre la proliferació. A l'estudi histològic, va destacar la severitat de les lesions del còlon, amb important participació limfocitària, entre els 3 i els 6 cicles de DSS en el model animal AOM/DSS. El paràmetre que va destacar va ser el nombre d'ACFs del còlon[1], que són lesions precursoras dels càncers de còlon induït per agents cancerígens com l'AOM [4]. Si els animals no reben AOM, els primers canvis morfològics i fenotípics que es poden relacionar amb el càncer colorectal associat a colitis es produeixen entre els 6 i els 9 cicles de DSS.

5. Discussió

També es van realitzar anàlisis d'expressió gènica i d'immunoreactivitat, seleccionant gens o proteïnes implicats en processos proliferació, inflamació, i apoptosi, que a priori poden tenir un paper més rellevant en la tumorigènesi associada a inflamació:

- Immunoreactivitat: β -catenina (CTNNB), COX-2, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) i ciclina D1 (CCND1).
- Expressió gènica: *ccnd1*, *tgfb1*, *tlr-2*, *tlr-4*, *tl-9*, *myd88*, *cox-2* i *bcl-2*.

L'activació de la via Wnt/ **β -catenina** a l'epiteli del còlon sembla ser un dels punts clau al procés d'iniciació de pòlips [5], relació que s'ha demostrat en estudis amb models murins de càncer colorectal induït per carcinogen [6]. A la literatura hi ha evidències de la relació entre l'alteració de l'APC, regulador de la β -catenina, i el desenvolupament de càncer colorectal [7]. A més del desenvolupament tumoral, la β -catenina, que forma part del complex E-cadherina/ β -catenina/ α -catenina de les AJs, juga també un paper important a la inflamació crònica, i podria ser útil com a biomarcador del càncer associat a colitis [6]. En coincidència amb els nostres resultats, altres autors han assenyalat que l'administració de AOM causa acumulació nuclear de β -catenina [8]. Al nucli, la β -catenina forma el complex transcripcional β -catenina/TCF/LEF (*T cell factor/lymphocyte enhancer factor*), i s'inicia la transcripció de gens vinculats a processos de proliferació, com *ccnd1* i *cox-2* [9] [10]. La hiperactivitat d'aquesta via, per tant, seria en part responsable del desenvolupament dels tumors [11]. (**Figura D.2**)

Els nostres resultats mostren un augment de la d'immunoreactivitat per la **CCND1** i **PCNA**, ambdós associats a la proliferació. La CCND1 regula el cicle cel·lular (forma complex amb CDK4 o amb CDK6, en la transició de l'etapa G_1 a la S) i el PCNA és un cofactor de la DNA polimerasa delta [12]. La localització del marcatge assenyalava les zones on es trobava una activitat replicativa, confirmant una major proliferació en augmentar el grau de displàsia i la severitat de la inflamació. Possiblement, aquesta activitat replicativa es pot associar amb l'activitat de les vies Wnt i TLR.

L'anàlisi d'expressió de *tgfb1* va evidenciar nivells elevats en el teixit inflammat (tant al grup D com al grup AD) i baixos al teixit no inflammat (al grup A, tant el teixit tumoral com no tumoral). La via del TGF(*transforming growth factor-beta*)- β juga un paper important en la modulació de la carcinogènesi de còlon en humans [13]. Mentre a les cèl·lules normals el TGF β atura el cicle cel·lular a l'etapa G_1 i promou l'apoptosi [14] [15] [16], en situacions patològiques el TGF β pot potenciar la divisió cel·lular [17] [16]. Així, en un ambient proinflamatori pot predominar la seva acció proliferativa i no es pot descartar el seu efecte protumorigènic. A la literatura es parla d'una forta correlació entre el grau de displàsia i l'expressió alterada dels TGFs en els ACFs, i per això és difícil demostrar canvis d'expressió de prou magnitud en lesions molt incipients [17] (tot i que els teixits estudiats al nostre treball presentaven ACFs i criptes amb diferents graus de displàsia, i hem observat canvis d'expressió de *tgfb1*). (**Figura D.11**)

La família dels TLRs té un paper clau en la detecció de patògens i la iniciació de respostes inflamatòries [18]. La seva activació sembla tenir un paper rellevant en la generació de displàsies com evidencia el fet que ratolins *germ free* no desenvolupin displàsies ni càncer colorectal associat a colitis [19] [20]. També s'ha demostrat que la senyalització alterada de les vies TLR pot agreujar el dany tissular, provocar una inflamació persistent, i propiciar fenòmens de tumorigènesi associada a inflamació [21] [19]. El TLR2 sembla tenir un paper protector del desenvolupament de càncer colorectal associat a colitis en el model murí AOM/DSS [22]. En canvi, en estudis de pacients amb IBD no es troben variacions de *tlr-2* [23], cosa que concorda amb els nostres resultats amb el model murí. Pel que fa a *tlr-4*, s'ha trobat sobreexpressat en biòpsies de pacients amb UC i CD [24], alteració que també vam observar en el teixit no tumoral del grup AD. Recentment s'ha descrit que el bloqueig de TLR-4 amb anticossos redueix la mida dels tumors, suggerint que l'absència de TLR-4 protegiria del desenvolupament de displàsia [25]. Els nostres resultats també suggereixen la participació de TLR-4 en la tumorigènesi: trobem nivells d'expressió elevats en el teixit no tumoral i baixos en els tumors del grup AD. En la literatura també es destaca la importància de TLR-9 en l'homeòstasi intestinal [26] exercint una doble funció: al domini basolateral TLR-9 produeix la degradació de IκBα i l'activació de la via NF-κB, mentre que l'estimulació del TLR-9 apical condueix a l'acumulació IκBα ubiquitinat al citoplasma, evitant l'activació de NF-κB [26]. A més, l'estimulació del TLR-9 apical confereix refractarietat a posteriors estimulacions [26] i, *tlr-9* presenta nivells d'expressió elevats en pacients amb colitis activa [27]. Així doncs, considerem els nivells d'expressió alts de *tlr-9* observats en teixit no tumoral del grup AD com a indicadors d'un estadi inflamatori crònic anterior a l'aparició de displàsies. Caldria estudiar si hi pot haver una relació entre la hiperactivitat de TLR-4 i la inactivació de TLR-9 en el CAC. També hem volgut tenir en compte la implicació d'una proteïna adaptadora important en la senyalització de la via TLR, la MyD88 [21], que senyalitza i activa diverses cascades de transducció com les del NF-κB, MAPKs (*mitogen-activated proteinkinases*) i membres de la família del factor regulador interferò (IFN) [28], activant la resposta immune i afavorint la carcinogènesi [29] [30] [31]. Els nostres resultats mostren que l'expressió de *myd88* es manté sense canvis significatius, mentre que els nivells d'expressió gènica de *tlr4* i *tlr9* varien, suggerint que altres proteïnes adaptadores podrien tenir un paper més rellevant en aquest procés. Una alternativa podria ser TRIF (TICAM), que també pot arribar a activar NF-κB, important regulador de processos inflamatoris, proliferatius i antiapoptòtics [32] [33], després de la degradació del seu inhibidor IκBα [32]. La literatura també indica que en algunes situacions, TRAF6 (*tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*) pot enllaçar-se a TRIF i activar NF-κB [31]. Així doncs, tot i que no trobem una alteració de l'expressió de *myd88* que es correlacioni amb els canvis observats en *tlr-4* i *tlr-9*, cal assenyalar que a través de TRIF/TLR4 es podria modificar l'activació de NF-κB [34]. També valdria la pena valorar si els canvis en l'activitat dels TLRs podrien deure's a alteracions en els seus reguladors negatius: estudis en IECs han evidenciat nivells elevats de TOLLIP (*toll-interacting protein*;

5. Discussió

proteïna amb domini Toll/IL-1R) que atenuen la resposta a LPS [35], mentre que en malalts de UC s'ha trobat nivells baixos de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; inhibidor de la via NF- κ B) [36]. Els resultats dels nostres estudis suggereixen que TOLLIP i PPAR γ podrien estar disminuïts en els grups que presenten inflamació. **(Figura D.8)**

La ciclooxigenasa (COX) participa en la fase inicial de la síntesi de prostaglandines, convertint l'àcid araquidònic en prostaglandina H₂, precursor de la resta de prostaglandines. Dels tres isoenzims descrits, **COX-2** és indetectable a la majoria de cèl·lules normals però esdevé abundant en macròfags i d'altres cèl·lules en una inflamació [37]. De fet, NF- κ B és un dels factors que controlen l'expressió de *cox-2* [38] [3]. També s'ha demostrat que COX-2 s'expressa en els processos de tumorigènesi en el còlon [39], en particular, al citoplasma de les cèl·lules d'epiteli neoplàsic de còlon, mentre que l'epiteli normal és negatiu per la COX-2 [40]. Altres estudis amb models murins AOM/DSS, han demostrat que l'expressió de COX-2 està incrementada en cèl·lules neoplàsiques amb mutacions al supressor tumoral *Apc* [40], pel que hi pot haver una relació causa-efecte entre la via Wnt i la COX-2. L'acumulació de β -catenina citosòlica als grups AD i D suggereix una major transcripció de la via Wnt, augmentant així els nivells de COX-2. Però l'expressió de *cox-2* només augmenta significativament al teixit tumoral del grup AD, coincidint amb altres estudis que han demostrat que la producció de COX-2 no és la responsable d'iniciar el desenvolupament de càncer colorectal associat a colitis [41], tot i que el pot potenciar. Fukata *et al* van suggerir que l'expressió de COX-2 també és dependent de TLR-4 i Myd88 en les cèl·lules epitelials intestinals del model murí AOM/DSS, on TLR-4 facilita la carcinogènesi incrementant la proliferació i inhibint l'apoptosi [42] (la COX-2 aporta resistència a l'apoptosi inhibint la via intrínseca [43]). A més, als nostres resultats es van observar nivells elevats d'expressió gènica de *tlr-4* en el teixit no tumoral del còlon dels ratolins del grup AD, la qual podria comportar una sobreproducció de COX-2 que, al seu torn, afavorís processos de proliferació. Seria doncs interessant corroborar aquest lligam amb la via Wnt. **(Figura D.9)**

El factor Bcl-2 forma part d'una família de proteïnes que comparteixen almenys un de quatre dominis BH (homologia *bcl-2*). Bcl-2 té funcions antiapoptòtiques mentre que d'altres membres de la família són factors proapoptòtics [44]. L'anàlisi d'expressió de *bcl-2* va mostrar una important disminució en grups amb inflamació, tant D com AD. Això podria indicar que hi hauria un major nombre de cèl·lules en apoptosi durant la inflamació. Per tant, s'hauria de valorar o bé mecanismes antiapoptòtics alternatius al Bcl-2, o bé realitzar una anàlisi més acurat de les possibles cèl·lules resistents a l'apoptosi que poden mantenir-se en la inflamació crònica i proliferar (potser una valoració d'immunoreactivitat enfront del Bcl-2 tissular del còlon del grup AD). **(Figura D.10)**

Un últim indicador d'inflamació analitzat va ser l'expressió d'*il10* (**Figures 1.16 i 1.22**). L'expressió d'*il10* disminuïa més en els grups amb inflamació, especialment en el cas del teixit no tumoral AD. Atès que la IL10 pot induir canvis notables en les poblacions de limfòcits que afecten al desenvolupament tumoral, aquest resultat fonamenta l'interès d'un estudi fenotípic de les poblacions leucocitàries.

5.1.2 Canvis d'expressió de miRNAs

Un cop analitzats els canvis d'expressió dels gens que hem mencionat, vam plantejar-nos valorar el nivell d'expressió de determinats miRNA. Dins de l'amplíssim ventall de miRNA descrit vam seleccionar-ne un grup que s'havia considerat rellevant en anteriors estudis sobre el CRC, prenent com a referència el treball de Slaby *et al* [45]). En tractar-se de molècules capaces d'afectar més d'un procés (cada miRNA pot tenir molts mRNAs diana i cada mRNA pot estar regulat per més d'un miRNA [46]), l'alteració de la seva expressió podria contribuir a la iniciació del càncer associat a inflamació, o ser un marcador de la progressió tumoral i la metastasi [47] [45]. Així, per exemple, diversos miRNAs participen en la regulació de vies de proliferació i supressió de tumors ja conegudes, implicades en la patogènesi del CRC com són les vies Wnt/ β -catenina i p53 [45].

Al nostre estudi es va evidenciar l'expressió alterada dels *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a* en teixit tumoral, que disminuïen en presència d'inflamació. En el model de Slaby (**Figura 1.23**) s'assenyala que *miR-135a* augmenta en l'estadi inicial i *miR-21* en diversos estadis del CRC. El fet que en tumors associats a colitis (animals del lot AD) es trobin disminuïts ens va fer pensar que podrien estar implicat en processos que marquin la diferència entre CRC i CAC. Per contra, els canvis trobats en *miR-145* i *miR-34a* són en la mateixa direcció que els que es descriuen en el model esmentat.

Un cop constatades aquestes alteracions, hem realitzat una anàlisi bioinformàtica dels gens diana candidats dels miRNAs d'interès, assenyalant algunes de les dianes que *a priori* poden intervenir en processos tumorigènics. Fruit d'aquesta anàlisi, hem ressaltat les següents dianes dels miRNA d'interès:

- per a *miR-135a*: *ptk2*, *stat6*, i *jak2*;
- per a *miR-21*: *pel11*, *tiam1*, *fasl*, *stat3*, *smad7*, *il12a*, *pdc4*, *jag1*, *btg2*, i *tgfbr2*;
- per a *miR-145*: *rtnk*, *angpt2*, *smad3*, *ctnnd1*, *tgfbr2*, *irs1*, *socs7*, *birc5*, *pak4*, i *klf4*;
- i per a *miR-34a*: *notch1*, *lef1*, *notch2*, *vcl*, *jag1*, *wnt1*, i *bcl2*.

A partir d'aquestes associacions miRNA-mRNA diana, hem realitzat una recerca bibliogràfica per analitzar les possibles repercussions que suposaria el canvi d'expressió dels miRNAs associats a inflamació i tumorigènesi.

La via del Wnt/ β -catenina

En absència del lligand Wnt, la β -catenina citoplasmàtica és fosforilada ràpidament per APC, CK1 α (*casein kinase 1 α*) i per GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) activada amb la qual forma un complex estable. Aquestes fosforilacions eviten l'acumulació de β -catenina, que és ubiquitinitzada i degradada [11]. (Figura D.1)

S'ha demostrat que la proteïna antitumoral APC és diana del miR-135a, de manera que l'expressió elevada de miR-135a promou la progressió d'adenomes colorectals a adenocarcinomes [11] per l'activació de la via Wnt/ β -catenina [48]. Els nostres resultats dels grups AD mostren una disminució de l'expressió del miR-135a juntament amb un augment del marcatge de β -catenina citoplasmàtica (anàlisi per IHQ; Figura 1.11), cosa que suggereix que l'increment d'APC no tingués prou entitat per, evitar l'acumulació de la β -catenina al citoplasma.(Figura D.1)

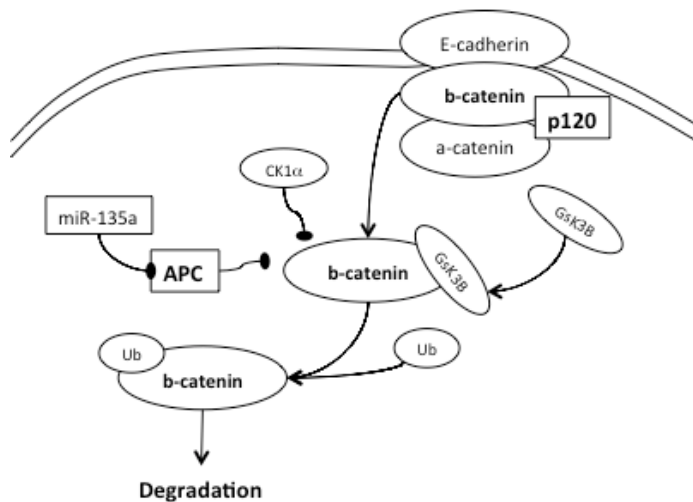


Figura D.1. Mecanisme a través del qual s'elimina normalment la β -catenina del citoplasma.[11] [48] En una situació normal, la β -catenina no s'acumula al citoplasma ni es transloca al nucli perquè existeixen mecanismes que ho eviten.

A la via canònica del Wnt, la unió de Wnt al receptor transmembrana FZD (*Frizzled*) forma un complex amb els co-receptors LRP (*Low-density-lipoprotein receptor-related protein*; LRP5/6), que fosforila i activa Dsh (*Disheveled*). L'activació de Dsh inhibeix GSK3 β i, per tant, deixa de formar un complex estable amb la β -catenina, disminuint la degradació d'aquesta per ubiquitinització i degradació proteosomal. Es produiria, doncs, una acumulació de β -catenina en citoplasma i nucli, on interactua amb co-reguladors de transcripció que inclouen el complex TCF/LEF per formar un complex β -catenina/LEF/TCF. Aquest complex regula la transcripció de

múltiples gens implicats en proliferació cel·lular, diferenciació, supervivència i apoptosi, que inclouen *c-myc*, *c-jun*, *akt1*, β -catenina, *tiam1* (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*), *stat3* (*signal transducer and activator of transcription 3*), *survivina* (*birc5*), o *ciclina d1* [49] [50] [11] [51]. (**Figura D.2**)

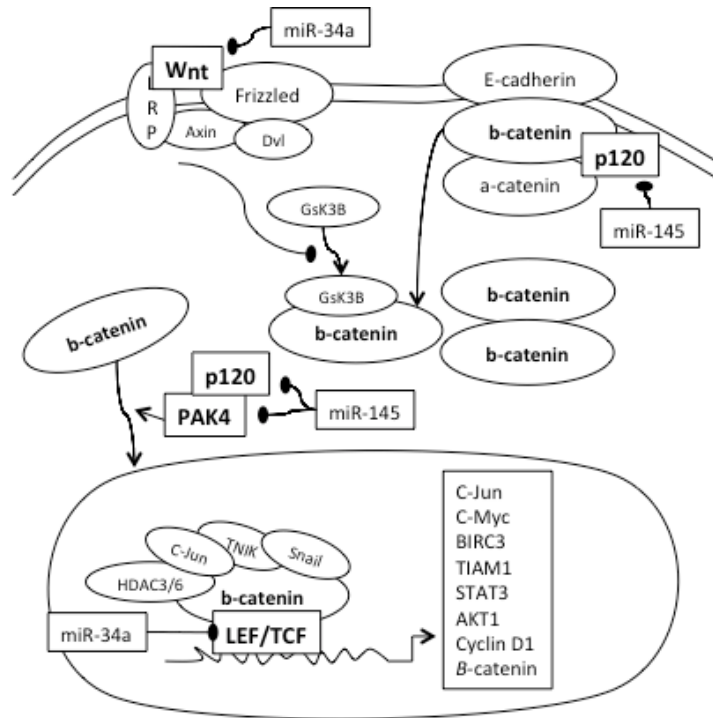


Figura D.2. Via canònica, amb lligand Wnt.[50] [11] [51] [10] [52] [53] [54]

PAK4 (*p21 activated kinase 4*) forma part d'una família de serin/treonin proteincinases, que regulen la reorganització citoesquelètica, la motilitat cel·lular, el desenvolupament embrionari, la supervivència i la regulació gènica. S'ha demostrat que la sobreexpressió de PAK4 permet la formació de tumors, i la seva supressió la inhibeix; això és perquè constitutivament PAK4 modula la senyalització de la β -catenina [51] [53]. Segons el nostre estudi, PAK4 seria diana del miR-145, i la disminució dels nivells d'expressió de miR-145 en tumors del grup AD i l'acumulació de la β -catenina al nucli, serien compatibles amb un augment dels nivells de PAK4. La catenina δ -1 (**p120**) és part del complex E-cadherina-catenines i modula PAK4. S'ha demostrat p120 és diana de miR-145, contribuint a la translocació aberrant de la β -catenina per part de PAK4 en els grups que presenten disminució dels nivells de miR-145 [52] [10]. (**Figura D.2**)

Segons els estudis que hem realitzat, **Wnt1** seria diana de miR-34a, pel que la via no-canònica de Wnt també podia estar activada en el grup AD (amb el miR-34a disminuït). En aquesta via, la β -catenina no es veu afectada, sinó que s'activen

5. Discussió

molècules efectores com les JNKs (*c-Jun N-terminal kinase*) [49]. Alguns estudis sobre models AOM/DSS mostren que l'augment de l'activitat de les JNKs accelera la tumorigènesi [55]; i en d'altres, la pèrdua de JNK resulta en una expressió elevada de β -catenina i dels gens diana del complex β -catenina/TCF[11]. Per això, la via no-canònica Wnt no semblaria tenir un paper clau en el desenvolupament tumoral del grup AD. (Figura D.3)

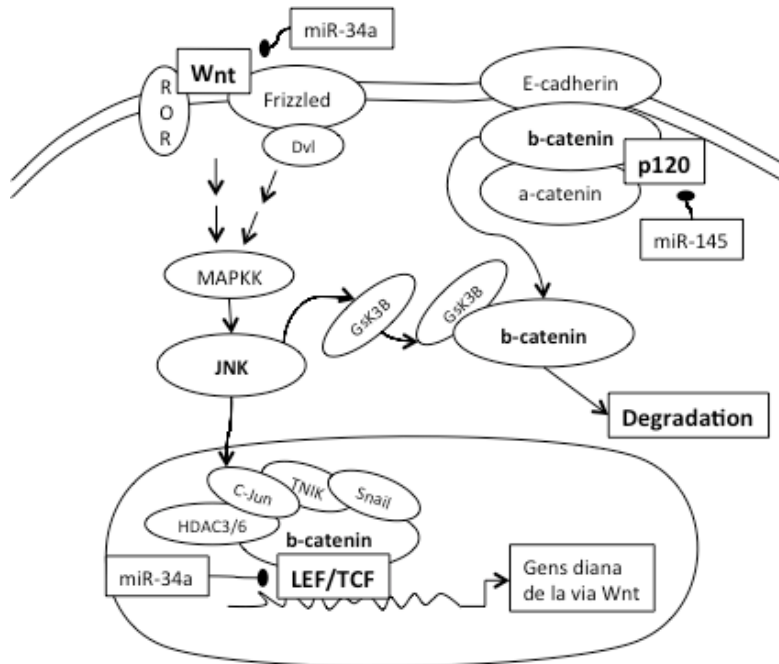


Figura D.3. Via no-canònica, amb lligand Wnt. [49] [11]

Entre els reguladors positius del complex β -catenina/TCF/LEF es troben **TIAM1** (*T lymphoma invasion and metastasis 1*) i **STAT3** (*signal transducer and activator of transcription 3*). (Figura D.4) *Tiam1* es troba sobreexpressat en molts CRCs, i és possible que pugui funcionar com a regulador positiu de la via Wnt canònica. TIAM1 és una diana corroborada de miR-21 [56] i un mediador de la via Wnt (a través de l'activació de la GTPasa Rac1, activa el complex β -catenina/TCF [5] [50]). TIAM1 podria doncs potenciar la proliferació tumoral en el model AOM/DSS: el grup AD va presentar disminució del miR-21, de manera que els tumors del grup AD podrien tenir una alta expressió de TIAM1 que retroalimentés la tumorigènesi a través de la via Wnt. (Figura D.4A) El complex β -catenina/TCF4 també regula el promotor del gen *stat3*, i l'STAT3 activat induïx l'acumulació citoplasmàtica de la β -catenina [11]. Els nostres resultats donarien suport a la importància d'aquest mecanisme de retroalimentació, que es pot relacionar amb nivells alts de STAT3 per la disminució de miR-21 en tumors del grup AD del model murí estudiat. (Figura D.4B)

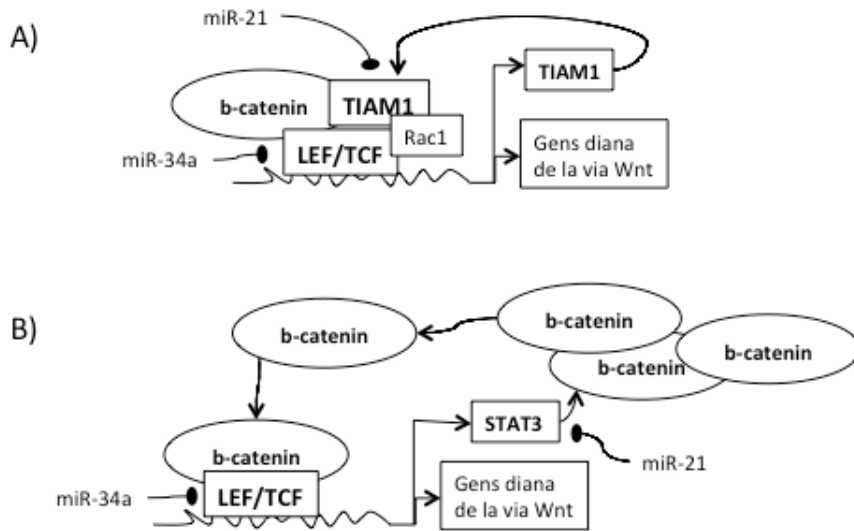


Figura D.4. Regulació positiva del complex β -catenina/TCF/LEF. A) Regulació pel TIAM1; i B) regulació per l'STAT3. [5] [50] [56] [11] [57]

Entre els reguladors negatius del complex β -catenina/TCF/LEF hi ha el **KLF4** (*Krüppel-like factor 4*). Aquest factor de transcripció es troba altament expressat en l'intestí humà normal, és crític per la diferenciació intestinal i inhibeix la senyalització de Wnt a través de la interacció directa amb el complex β -catenina/TCF4 [11]. El miR-145 té KLF4 com a diana directa [58], de manera que caldria esperar uns nivells elevats de KLF4 al grup AD. L'alta incidència de tumors en aquest grup fa pensar que l'acció de KLF4 podria ser una resposta compensatòria a l'activació de diverses vies tumorigèniques.

L'acumulació de β -catenina observada, que activaria la proliferació cel·lular a través del complex β -catenina/LEF/TCF [11], també es podria deure a altres motius independents de la via Wnt. (**Figura D.5**) Un d'ells seria la dissociació del complex E-cadherina/ α -catenina/ β -catenina (**Figura D.5: #**), que depèn també de la fosforilació de β -catenina a través de: (i) l'activació d'EGFR, i (ii) la fosforilació de l' α -catenina [11]. Un altre motiu seria l'activitat de l'AKT1 (PKB) (**Figura D.5: □**), mediador principal de la via PI3K/AKT activat indirectament per **PTK2** (*Protein Tyrosin Kinase 2*; o bé FAK; *Focal Adhesion Kinase*). Segons el nostre estudi, PKT2 seria una diana candidata del miR-135a, pel que, en els tumors del grup AD, la via PI3K/AKT podria estar sobreactivada, augmentant la proliferació cel·lular. L'AKT també activa la proteïna antiapoptòtica **Survivina/BIRC5**, que proposem com a diana de miR-145, i que està expressada en la majoria de càncers com a resultat de l'activació de diversos factors de transcripció oncogènics com NF- κ B, STAT3, Notch, i el complex β -catenina/LEF/TCF [11] [59] [60]. També hi ha publicacions que han associat nivells baixos de **PDCD4** (*programmed cell death 4*) amb la inhibició de la E-

5. Discussió

cadherina i una acumulació de β -catenina [61]. (**Figura D.5:§**) Als nostres resultats proposem PDCD4 com a diana de miR-21. PDCD4 estaria elevat en els tumors del grup AD i l'acumulació de β -catenina dependria d'un mecanisme diferent de PDCD4.

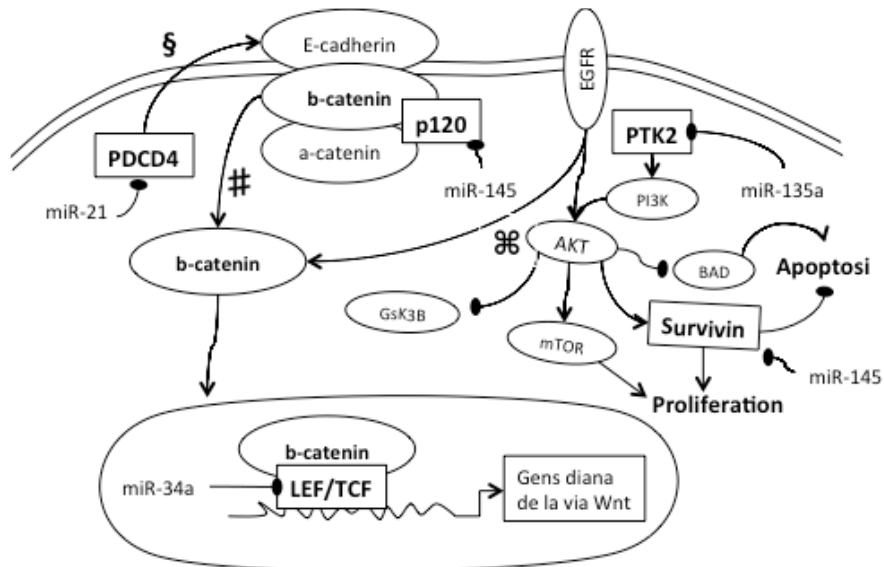


Figura D.5. Altres acumulacions de β -catenina. El significat dels símbols (⊠, # i §) es troba comentat al redactat.[60] [11] [61] [59] [62]

Adhesió cel·lular

Les alteracions a les TJs comporten un augment de permeabilitat paracel·lular [63]. En el cas del còlon, l'enorme quantitat d'antígens, productes bacterians i estímuls potencialment inflamatoris a la llum intestinal fa que una major permeabilitat pugui ser particularment rellevant. L'accés d'aquestes substàncies a l'interstici estimularia la senyalització TLR, provocant la secreció de citocines, les quals al seu torn alterarien també la funció barrera [64] i afavoririen la sobreexpressió de COX-2, i la síntesi d'alts nivells de prostaglandines. Aquestes últimes promouen la producció de factors de creixement, com ara el EGF (*epidermal growth factor*; factor de creixement epidèrmic) [65]. Com a resultat d'aquest procés es pot generar un cercle viciós en el qual l'increment de permeabilitat reforci respostes proliferatives de l'epiteli.

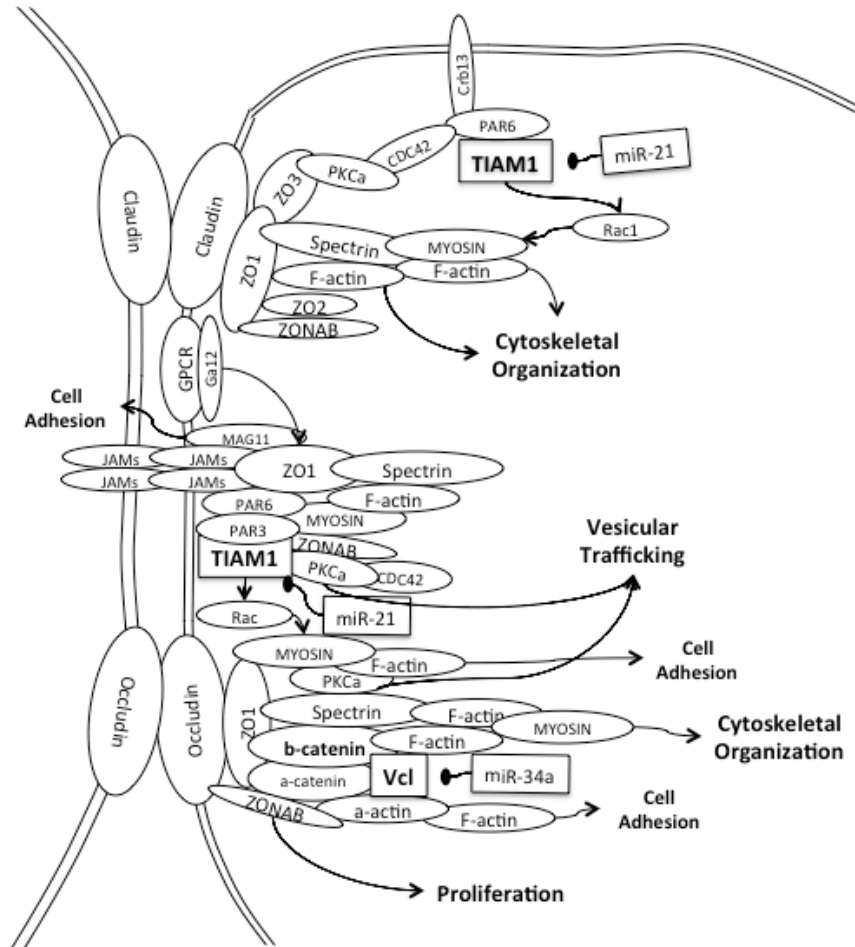


Figura D.6. Model de la participació de TIAM i Vcl en l'adhesió cel·lular.[66] [63] [68] [59] [69] [70] [56]

La **Vcl**, present als complexos de proteïnes que formen les TJs [63], ha estat corroborada com a diana de miR-34a en cèl·lules HeLa [66]. La baixa expressió de miR-34a en el teixit tumoral del grup AD podria donar lloc a nivells elevats de Vcl, ocasionant canvis en els mecanismes de tensió del citoesquelet de la cèl·lula. Aquest és un dels factors que podrien contribuir a la displàsia observada. (**Figura D.6**)

TIAM1 intervé en l'adhesió cel·lular, la motilitat, la resistència a l'anoikis [67]) i la progressió del cycle cel·lular [59] [68]. TIAM1 es troba sobreexpressat en el CRC, fet que està associat a un alt potencial agressiu i metastàtic de CRC [68] [59]. Això es pot deure al seu rol en el manteniment de les AJs i les TJs, i en la polarització apical-basal de l'epiteli [69]. Considerant que hem trobat nivells baixos de miR-21 i que TIAM1 n'és una diana corroborada en el CRC [56], podem assumir que TIAM1 es

5. Discussió

troba elevat en el teixit tumoral del grup AD i podria alterar la via Wnt i afavorir les alteracions observades en l'arquitectura tissular del còlon. (Figura D.6)

El **p120**, possible diana del miR-145, enllaça amb el domini citoplasmàtic de les cadherines i pot promoure la migració cel·lular [52]. A la vista del fet que no hem trobat evidències de metastasi, proposem que l'augment de p120 que seguiria a la disminució del miR-145 actuaria com a modulador de PAK4 (translocant junts la β -catenina), més que no pas afavorint la migració cel·lular. (Figura D.7)

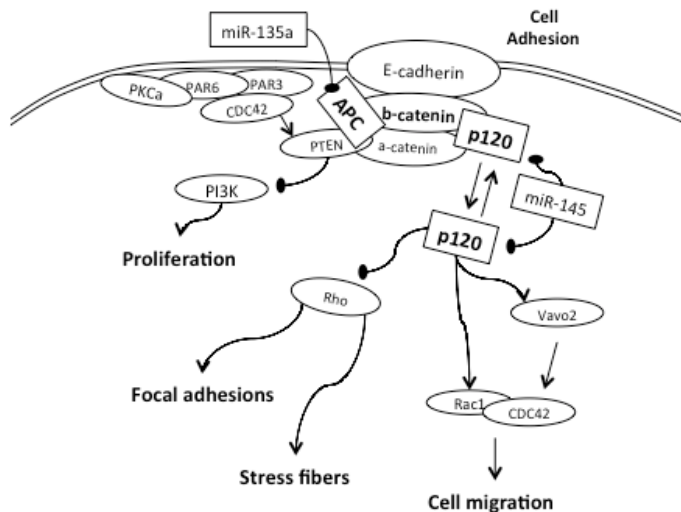


Figura D.7. Representació de la participació dels p120 i APC a l'adhesió cel·lular.[71] [52] [48]

Via TLR

Diversos miRNAs estan implicats en la regulació de la senyalització dels TLRs i de vies de la immunitat innata [21]. Per altra banda, l'activació dels TLRs pels seus lligands és capaç d'induir miRNAs [72] i alguns d'ells es troben augmentats en diversos tipus de càncers [73]. És possible, doncs, que la inflamació crònica porti a l'expressió desregulada de miRNAs activats per una sobreexpressió de TLRs, o per una activació perllongada dels seus lligands, contribuint a la patogènia de la malaltia [74]. A la **Figura D.8** es mostren les principals interaccions conegudes entre miR-21 i vies TLR.

El miR-21, tot i estar classificat com a 'onco-miR' per la seva expressió aberrant en nombrosos càncers, també és clau en moltes vies d'inflamació i en la senyalització dels TLRs [75] [76]. **PDCD4**, diana corroborada a la literatura[77], és un supressor tumoral crucial en la regulació negativa de la resposta inflamatòria a LPS, on actua com agent antiinflamatori en un *feed-back* negatiu[78]: l'activitat de NF- κ B és necessària per a la inducció de miR-21 i, via PDCD4, miR-21 inhibeix NF- κ B i les

seves dianes transcripcionals proinflamatòries [75] [79]. La disminució de miR-21 augmentaria els nivells de PDCD4 i incrementaria l'activació de NF- κ B així com de la citocina proinflamatòria IL-6, i disminuiria els nivells de la citocina antiinflamatòria IL-10. Precisament als nostres experiments es produeix la disminució de miR-21 en els tumors dels grups AD, això suposaria un augment de PDCD4 que afavoreix l'activació de NF- κ B; malgrat tot, els nostres resultats suggereixen una activació considerable de NF- κ B al còlon dels ratolins amb inflamació (també en el teixit no tumoral del grup AD, on el miR-21 es troba elevat i, llavors, PDCD4 estaria disminuït). Això podria deure's a una altra de les dianes que proposem per miR-21: Pellino1 (**Peli1**). Peli1 és una ubiquitin-ligasa implicada en l'activació d'NF- κ B a través de la senyalització dependent d'IL-1R/TLR, i ja ha estat corroborada com a diana de miR-21 en teixit hepàtic [80]. La disminució de miR-21 trobada en el grup AD suggereix que la participació de Peli1 i PDCD4 podria reforçar l'activació final de NF- κ B en la via dels TLRs. La capacitat de la família dels Pellinos per enllaçar tant amb IRAK1 com amb TRAF6, els assenjala com elements essencials per l'activació final de NF- κ B. A més, s'ha observat que Peli1 no activa la via de les MAPK, reforçant l'argument de l'activació del NF- κ B [81] [76] [82]. (**Figura D.8**)

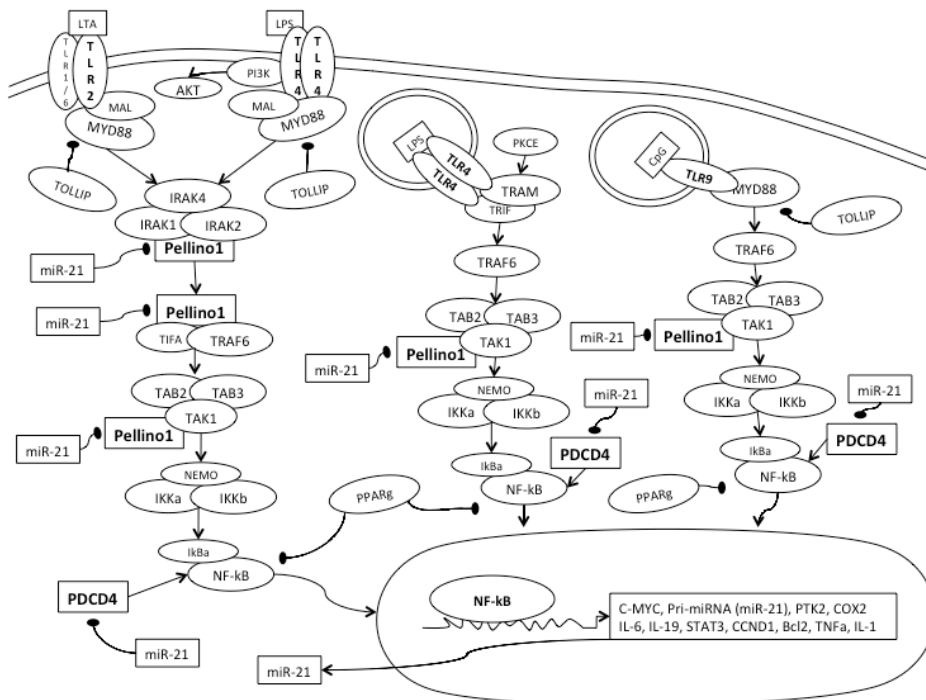


Figura D.8. Via de senyalització dels TLRs.[31] [81] [83] [34] [84] [79]

Via COX-2

L'activitat de **HIF-1 α** , regulador de VEGF [85] [86], afecta tant a l'angiogènesi tumoral [87] com a la producció de COX-2. Segons el nostre estudi predictiu, HIF-1 α és diana potencial del miR-145, reduït en el teixit tumoral del grup AD. De manera que la disminució de miR-145 podria potenciar l'angiogènesi via HIF-1 α , activant processos de proliferació tumoral i afavorint la producció de COX-2. (Figura D.9)

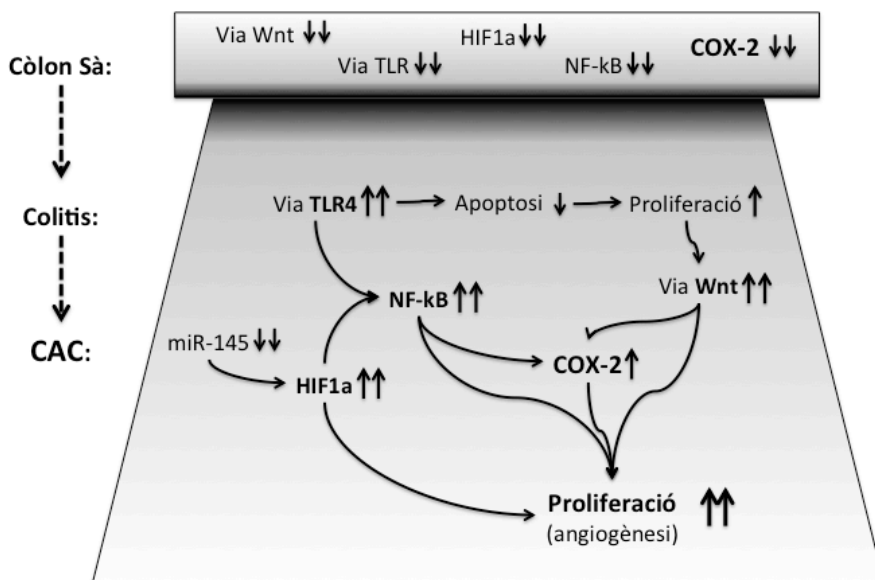


Figura D.9. Resum de la implicació de COX-2, miR-145 i HIF-1 α al model murí estudiat.[88] [42]

S'ha descrit també que els monòcits circulants TEM (*TIE2-expressing monocytes*) humans i murins s'acumulen en àrees perivasculars i d'hipòxia dels tumors, i contribueixen a l'angiogènesi. Els TEM expressen el fenotip TIE2+ VEGF+ CCR2-CCR5+. TIE2 és receptor d'**ANG2** (*angiopoietin-2*; ANGPT2), que activa una vasculogènesi alternativa al VEGF. La hipòxia estimula l'expressió i l'activitat proangiogènica d'ANG2 en macròfags humans i murins [89]. S'ha vist que el bloqueig d'ANG2 desactiva els TEMs, inhibint el creixement tumoral, l'angiogènesi i la metastasi en molts models murins [90] [91]. Hem assenyalat l'ANG2 com a diana teòrica de miR-145, que està disminuït en el teixit tumoral del grup AD. Així, podria haver-hi un augment d'ANG2, capaç de promoure l'angiogènesi i per tant el desenvolupament tumoral en concomitància amb la inflamació.

Apoptosi

La disminució de l'apoptosi pot ser deguda a la inactivació de factors apoptòtics o a l'activació de factors antiapoptòtics. En aquest treball hem volgut considerar ambdues possibilitats.

S'ha demostrat que el mecanisme apoptòtic predominant en la UC és la via extrínseca en la qual intervé **FasL** [92], una diana teòrica de miR-21. Però no observem l'efecte antitumoral que esperariem si FasL augmentés, com caldria suposar davant una reducció de miR-21. (**Figura D.10**). FasL podria estar intervenint en la mort de les nombroses cèl·lules epitelials i immunitàries en l'estadi inflamatori, però no ser el mecanisme predominant per produir l'apoptosi de cèl·lules tumorals.

El supressor tumoral **p53** intervé en el cicle cel·lular induint la seva aturada i la reparació del DNA, i en l'apoptosi activant mecanismes proapoptòtics i inhibint els antiapoptòtics [93]. El p53 és activat per l'expressió desregulada d'oncogens, com c-Myc i Ras, via ARF-MDM2 [94] [95]. En models AOM/DSS la immunoreactivitat a p53 s'ha trobat disminuïda [96], suggerint una inhibició de la via de p53 associada a la inflamació. També s'ha comprovat que p53 actua com regulador post-transcripcional modificant els membres de la família miR-34 [94] i en situacions d'estrès cel·lular podria facilitar la regulació simultània de diversos processos [94]. Com p53, els membres de la família miR-34 poden considerar-se supressors tumorals [45]. En el CRC s'han trobat nivells disminuïts del miR-34a [97], que podrien suposar un avantatge selectiu per les cèl·lules cancerígenes, ja que faria possible la sobreexpressió de dianes relacionades amb processos de proliferació cel·lular [94]. MiR-34a té com a dianes **BIRC5** i **Bcl-2** (també suggerides al nostre estudi predictiu), entre d'altres [94]. (**Figura D.10**)

L'activació de **BTG2**, via p53, és un altre mecanisme que disminueix la proliferació i afavoreix l'apoptosi frenant el desenvolupament tumoral [98]. Segons l'estudi predictiu que hem realitzat, BTG2 seria diana del miR-21, el qual es troba disminuït a les mostres de teixit tumoral del grup AD. BTG2 podria ser doncs un senyal compensatori front a l'activació d'altres vies tumorigèniques que estaria inhibint la proliferació tumoral en el model AOM/DSS. (**Figura D.10**)

El factor antiapoptòtic **Bcl-2** és una diana d'interès de miR-34a que ha estat confirmada [99]. Tot i que la disminució de miR-34a en el teixit tumoral del grup AD suposaria un augment dels nivells de Bcl-2, l'anàlisi d'expressió de *bcl-2* va mostrar una important disminució en grups amb inflamació, tant D com AD. Això podria reflectir que en la finestra temporal en la qual hem realitzat l'anàlisi de Bcl-2, estiguem veient encara un predomini d'apoptosi relacionat directament amb el fenomen inflamatori, més que no pas en la tumorigènesi. Així, la participació d'aquest factor podria tenir un paper més relacionat amb la inflamació que no pas amb la tumorigènesi. (**Figura D.10**)

5. Discussió

Un altre mecanisme antiapoptòtic és la inactivació de la ProCaspasa-8 per part del **PAK4** [100], el qual és una diana de miR-145 suggerida a l'estudi predictiu i corroborada a la literatura [53]. La disminució de miR-145 augmentaria els nivells de PAK4, induint un efecte antiapoptòtic a través de la inhibició de la ProCaspasa-8 i Bad. De fet, el paper antiapoptòtic de miR-145 s'ha demostrat amb la restauració dels seus nivells en línies cel·lulars de CRC [101]. **KLF4** és una altra diana suggerida de miR-145 i corroborada en cèl·lules mare embrionàries humanes [58]. En línies cel·lulars intestinals s'ha trobat que KLF4 regularia el pas o cap a l'aturada del cycle cel·lular o cap a l'apoptosi, depenent de l'abast del dany del DNA [102]. Un últim mecanisme antiapoptòtic modulad per miR-145 seria el mediador antiapoptòtic **RTKN** [103], diana de miR-145 corroborada en estudis de càncer de mama [104], i que segons el nostre estudi predictiu podria estar elevat als tumors del grup AD. (Figura D.10)

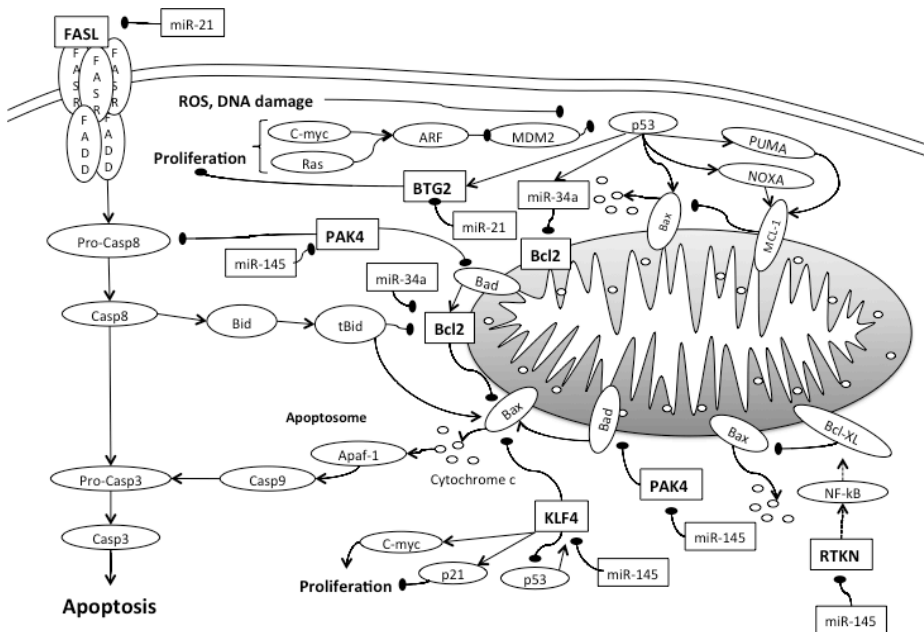


Figura D.10. Representació adaptada de l'apoptosi.[105] [95] [106] [45] [98] [100] [53] [58] [102] [103]

Via del TGF β

L'estudi predictiu realitzat va suggerir que **TGFBR2** podria ser diana de miR-21 i de miR-145, **SMAD3** diana de miR-145, i **SMAD7** diana de miR-21. En línies cel·lulars, altres autors han confirmat TGFBR2 [107] i SMAD7 com a dianes de miR-21 [108] [109]. Nosaltres hem observat una disminució d'expressió d'aquests miRNAs en el

teixit tumoral del grup AD, fet que suggereix que els nivells de les dianes es trobarien elevats, afavorint la proliferació. (Figura D.11)

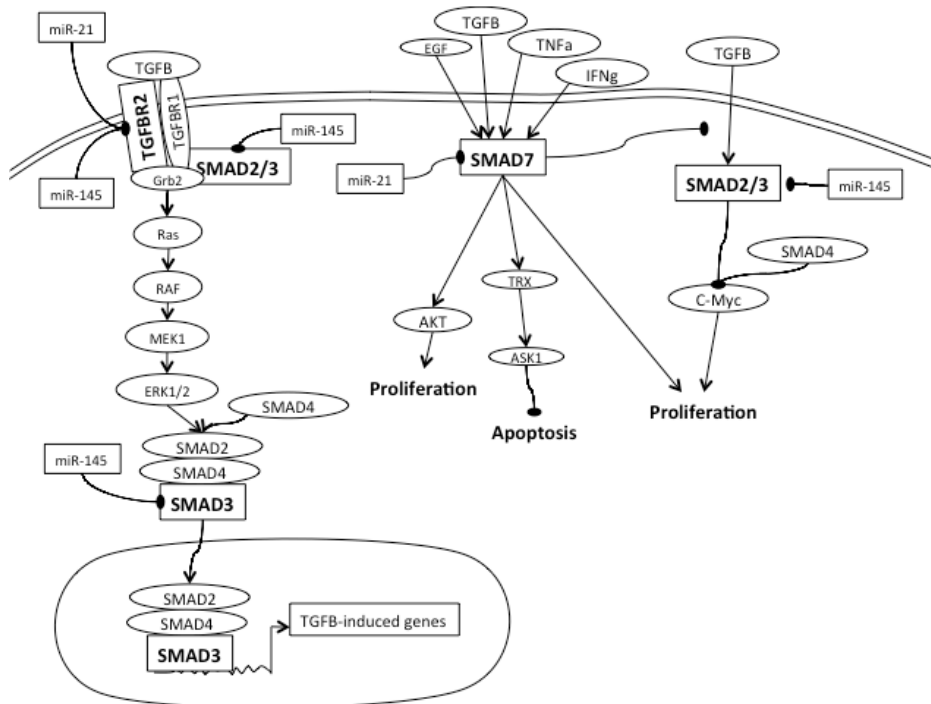


Figura D.11. Model de la possible relació entre els miRNAs estudiats i les seves dianes a la via TGFβ.[110] [37]

Vies STAT

A l'estudi predictiu que hem realitzat, diversos elements de les vies STATs són possibles dianes dels miRNAs que hem trobat modificats: **STAT3** (diana de miR-21), **STAT6** (*signal transducer and activator of transcription 6*; diana de miR-135a) i **JAK2** (*Janus kinase 2*; diana de 135a). (Figura D.12)

STAT3 participa en processos de proliferació cel·lular (diferenciació, regeneració cel·lular, angiogènesi i tumorigènesi), apoptosi (evasió de l'apoptosi en tumors), metàstasi i també en la resposta immune (inflamació i evasió de la resposta immune en tumors)[111]. La inhibició de la via JAK2/STAT3 indueix apoptosi en CRC, a través de la via intrínseca [112]. La proliferació tumoral observada al grup AD del nostre estudi reforça la teoria de l'actuació de JAK2/STAT3 com a mecanisme antiapoptòtic (elevats, en disminuir miR-135a i miR-21). També hi ha evidències de la participació de STAT3 en molts càncers (inclosos pacients amb CAC) a través de la cascada NF-κB-IL-6-STAT3 [113] [114], la qual és un important regulador de la

5. Discussió

proliferació i de la supervivència de cèl·lules epitelials tumorals. El STAT3 epitelial és intervén en la senyalització d' IL-6, un important promotor tumoral al CAC [115]. S'han trobat nivells elevats d'IL-6 i IL-17A al microambient intestinal, i un increment de STAT3 fosforilat en els ACFs en models murins AOM/DSS [22]. A més, miR-21 forma part d'un circuit de retroalimentació tumoro-inflamatori en el que STAT3 activa directament miR-21, i aquest indirectament manté NF-κB activat [116] [21]. Suposem, per tant, que la cascada NF-κB-IL-6-STAT3 es trobaria hiperactivada en el teixit tumoral del grup AD. (**Figura D.12**)

A la literatura s'evidencia un increment de STAT6 fosforilat a l'epiteli de còlon d'individus amb UC [117] i una relació de STAT6 amb el desenvolupament tumoral [118]. Hi ha estudis que també han relacionat el canvi d'activació de STAT6 a STAT3 amb l'aparició de displàsies en pacients amb colitis [114]. Al teixit tumoral del grup AD estudiat, hi vam observar disminució tant de miR-21 com de miR-135a, de manera que els nivells de STAT3 i STAT6 aparentment estarien elevats.

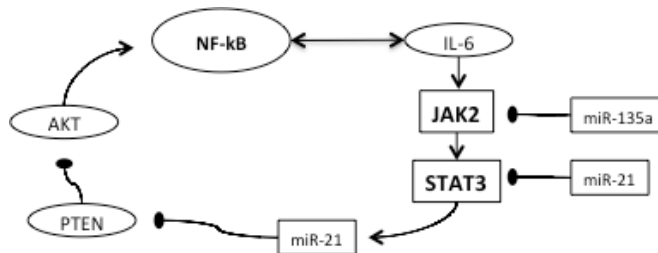


Figura D.12. Model adaptat de la possible participació de STAT3 i JAK2 al nostre estudi.[116]

A la literatura es relaciona l'activació de STAT3 i STAT6 amb la polarització de macròfags M2, precursors dels macròfags associats a tumors (TAMs). De fet, s'ha demostrat que l'activació constitutiva de STAT3 en cèl·lules tumorals i en diverses cèl·lules immunes infiltrants en tumors, incloent-hi els TAMs, inhibeix la producció de citocines i quimiocines proinflamatòries [119]. Així doncs, STAT3 i STAT6 podrien estar implicats en el desenvolupament del CAC, i caldria aclarir el paper que realitzen. (**Figura D.12**)

Altres vies

El nostre estudi predictiu també va identificar candidats de les vies de la insulina i Notch: **IRS-1** (*insulin receptor substrate-1*; diana de miR-145; corroborada a la literatura en mostres de CRC [120] i de UC [121]), **Notch1**, **Notch2** (dianes de miR-34a), i **Jag1** (*Jagged-1*; lligand de Notch, i diana de miR-21 i miR-34a). Són resultats que podrien tenir rellevància perquè s'han trobat relacions amb processos associats amb tumorigènesi. Pel que fa l'IRS-1, sovint s'han trobat els nivells elevats en càncers humans i baixos, o fins i tot absents, en condicions fisiològiques [122].

L'activació de IRS-1 inhibeix l'apoptosi i la diferenciació cel·lular [123], i afecta vies de senyalització com PI3K/AKT i ERK/MAPK [124] [45]. La disminució de miR-145 podria, doncs, incrementar la senyalització d'aquestes vies i afavorir la tumorigènesi. Altres evidències han confirmat per una banda que les vies de senyalització de Notch i NF-κB regulen respectivament la funció de cèl·lules mare i la inflamació a l'intestí [125], i per una altra que les vies Wnt, i Notch, s'han trobat simultàniament activades en el CRC [126]. Per això, estudis exhaustius sobre aquesta via podrien aportar informació valuosa sobre el desenvolupament del CAC.

Amb aquests estudis hem volgut realitzar una anàlisi prospectiva de les possible conseqüències dels canvis d'expressió d'aquests microRNAs sobre el desenvolupament tumoral en un context inflamatori. La verificació del valor de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a* com a conjunt biomarcador requeriria valorar si aquests canvis es reproduïen en altres models animals de CAC i quantificar els canvis d'expressió en cadascun dels gens diana indicats, tasca que per la seva dimensió i complexitat ultrapassa els objectius d'aquest treball.

5.2 Estudis en mostres humanes

5.2.1 Ontologia gènica

La identificació de mutacions en tumors s'ha revelat com una eina útil per predir la resposta al tractament i ajustar el pronòstic dels pacients amb CRC [93]. Més enllà dels canvis en el DNA, les alteracions de l'expressió gènica poden aportar informació complementària, sobretot pel que fa a l'evolució d'una situació clínica a una altra. De fet, alguns autors han comprovat que certs gens implicats en el càncer tenen expressions semblants en UC i CAC [127] [128], i altres diferents [92] [129] [128]. En aquest estudi s'han analitzat els canvis d'expressió gènica en mostres d'individus sans, pacients amb UC o amb CRC, per cercar patrons d'expressió gènica que assenyalin el gir d'una situació inflamatòria cap a un procés tumorigènic. A partir dels resultats GO, hem obtingut llistats de grups de gens associats als processos d'interès que considerem bons candidats a biomarcadors del desenvolupament del CAC o de processos tumorals associats a inflamació: *brca1*, *brca2*, *nbn*, *tp53*, *dock2*, *cxcl12*, *a2m*, *atf4*, *fcgr1g*, *rhou*, *smad3*, *ptk2b*, *nrp1*, *itga8*, i *eps8*.

El grup de gens *brca1*, *brca2*, *nbn*, i *tp53*, associats a la reparació del DNA, s'han seleccionat a partir dels resultats en les comparacions Ade_Col_Up vs Ade_Con_Up; es tractaria de gens estimulats en adenomes i, per tant, relacionats amb la tumorigènesi. Destaquen els gens ***tp53*** (p53) i ***brca1*** (*Breast cancer 1*) i ***brca2*** (*Breast cancer 2*), components del complex proteic encarregat de la supervivència i la reparació del DNA. El complex està format per sensors de dany del DNA i supressors tumorals, que interaccionen amb la RNA polimerasa II i els complexos de

5. Discussió

desacetilases d'histona, i controlen la transcripció actuant sobre l'estructura de la cromatina. Els components més coneguts d'aquest complex són BRCA1 i BRCA2, presents al llistat de gens que hem trobat alterats, però també conté **NBN** (*nibrin*; NBS1; *Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1*), MLH1, MSH2, i MSH6, entre d'altres [130] [131]. BRCA1 és un supressor tumoral, expressat a la mama i altres teixits, crític en el manteniment de l'estabilitat genòmica [132] [133]. Hi ha autors que han demostrat la participació de BRCA1 en la biogènesi de miRNAs a través de l'activació de DROSHA, junt amb Smad3 i p53 (a la discussió sobre els resultats del model murí ja s'han descrit les repercussions de les alteracions d'aquest supressor tumoral en les patologies que estudiem) [134] [133]. L'abast que podria tenir l'alteració gènica de BRCA1 en el processament de miRNAs, explica part de la seva importància en el CRC, i possiblement també en el biaix de UC cap a CAC. El *brca2* (*Breast cancer 2*) és un gen reparador de DNA implicat en la recombinació homòloga i s'ha demostrat que juga un important paper en la proliferació en tumors de pròstata, mama o pàncrees, entre d'altres [135]. Hi ha estudis que relacionen la seva mutació amb el risc de patir CRC [136] [137], cosa que suggereix el paper de BRCA2 com a gen supressor tumoral en el CRC [135].

El CREB2 (*atf4*), és un factor de transcripció que està alterat a les comparacions Ade_Col_Down vs Col_Con_Up&Down i Ade_Con_Up vs Col_Con_Up&Down. Tot i que les comparacions no semblarien concloents, a la literatura s'indica que CREB2, junt amb NF-kB, regula l'expressió de *cox-2* [138]; de manera que és un factor de transcripció que podria participar en el desenvolupament de càncer de còlon associat a colitis a través de la via de COX-2, és a dir, en la potenciació de la proliferació.

El nostre estudi relaciona la quimiocina **CXCL12** (*Stromal-derived factor-1*; SDF-1) amb la inflamació i la tumorigènesi del còlon: apareix a la recerca per paraules clau relacionades amb la tumorigènesi ("*Adhesion*") i a la comparació de Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down. En altres estudis s'ha demostrat que CXCL12, junt amb el seu receptor CXCR4, juga un paper tant en condicions fisiològiques normals com en la inflamació de la mucosa intestinal. Altres estudis amb ratolins amb colitis induïda per DSS han demostrat que l'eix quimiotàctic CXCL12/CXCR4 té un paper important en la IBD, en particular en l'UC [139]. Van demostrar que expressió elevada de *cxc12* en la mucosa del còlon influeix en el reclutament de cèl·lules inflamatòries cap al còlon inflammat [139]. S'ha suggerit que l'activació de CXCL12/CXCR4 a través de l'alteració d'altres vies, com la senyalització de TGF- β , pot iniciar el reclutament de cèl·lules que promouen la metastasi i inhibeixen les respostes immunes antitumorals. També s'ha constatat la relació entre l'expressió de CXCL12/CXCR4 i la tumorigènesi colorectal [140] [141]. També s'ha relacionat CXCL12 amb processos d'angiogènesi i metastasi en el còlon [140]; en part, a causa de la participació de CXCL12 en el reclutament de TAMs [142] [143]. Així doncs, CXCL12 és un candidat interessant per realitzar més estudis relacionats amb el desenvolupament del CAC.

Al nostre estudi, l'**A2M** (*alpha-2-macroglobulin*; alpha-2-M) destaca en la recerca per paraules clau associades a inflamació: apareix fins en 6 processos GO alterats, tots del grup Col_Con_Up&Down. L'A2M és una proteïna d'unió multifactorial inhibidora de proteïnases (com la MMP9 [144]), que s'ha trobat disminuïda en estudis amb mostres de pacients amb CRC, i s'ha arribat a suggerir com a biomarcador de pronòstic en pacients amb CRC [145] [146] [147]. També s'ha associat amb la resposta immune innata, on s'ha trobat evidències del paper regulador dels complexos A2M-proteïnases en la resposta immune [148]. Precisament, hi ha evidències que demostren que els macròfags detecten la presència dels complexos A2M-proteïnasa, cosa que incrementa la síntesi de PGE2 en els mateixos macròfags [149]. Potser per això A2M s'ha trobat reduït en sèrum de pacients amb UC en fase activa en comparació amb individus sans [150]. Caldria realitzar estudis que aclareixin la validesa de A2M com a biomarcador en el desenvolupament de CAC i de quina forma intervé en el procés, per exemple, si contribueix a la sobreactivació de la via TLR4 en els macròfags de la *lamina propria*.

Dock2 (*Dedicator Of Cytokinesis 2*) i **rhov** (*Ras Homolog Gene Family, Member U*; WRCH1) es van obtenir a partir del llistat de gens en observar quins processos GO relacionarien la inflamació amb la tumorigènesi: Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down. L'aparició de DOCK2, un factor d'intercanvi de nucleòtids de guanina que promou l'activació de RAC1, en el llistat de coincidències de Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down suggereix que l'expressió alterada de DOCK2 podria desestabilitzar la senyalització NF- κ B i Wnt/ β -catenina induint el desenvolupament tumoral associat a inflamació. Els senyals de la via Wnt no-canònica activen la cascada de senyalització RHOA/RHOU/RAC/CDC42, entre d'altres, cosa que afecta la regulació de la polaritat tissular, el moviment de les cèl·lules i l'adhesió cel·lular [151] [152]. RHOU és un membre de la família d'homòlegs Ras, i codifica una proteïna lligadora de GTPs que pot activar JNK1 i intervenir els efectes de la senyalització Wnt: a través de l'augment de la fosforilació de c-Jun, RHOU influeix en la interacció c-Jun-TCF4 [153] [154]. A més, hi ha estudis sobre progressió tumoral que han detectat una disminució de l'expressió de *rhov* en CRC [155].

Al nostre estudi també es van seleccionar **Ptk2b** (*Protein Tyrosine Kinase 2 Beta*; o bé FAK2) i **eps8** (*EGFR Pathway Substrate 8*) en el llistat de gens en la recerca dels processos GO que relacionarien la inflamació amb la tumorigènesi: Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down. La PTK2B és una proteïn-tirosina cinasa que integra senyals de factors de creixement i regula processos importants com la supervivència cel·lular i l'angiogènesi a través de l'activació de PI3K, AKT, MAPK i d'altres cascades de senyalització [62] [16]. PTK2B pot estar implicat en la regulació coordinada de l'estructura i la senyalització citoesquelètica [156]: s'ha suggerit que PTK2B és important per la reorganització citoesquelètica dels monòcits, necessària per a la seva motilitat cel·lular i sembla ser un requisit pel seu reclutament *in vivo* cap a

5. Discussió

punts d'inflamació [157] [158]. A més, PTK2B participa en la proliferació tumoral inhibint l'activitat apoptòtica de p53 a través de MDM-2, activant les vies de senyalització AKT-mTOR, i actuant a l'inici de la via Wnt [62]. Això assenyala PTK2B com a una prometedora diana terapèutica que cal continuar estudiant. La EPS8 és un substrat de tirosin-cinases que regula moltes vies de senyalització relacionades amb la proliferació i la migració [159], i podria regular l'expressió de PTK2 a través de l'activació de mTOR/STAT3 [159]. Hi ha evidències d'una variació de l'expressió d'*eps8* al llarg del desenvolupament i progressió del CRC: s'ha observat una disminució en adenomes i carcinomes inicials [160], però una sobreexpressió en estadis avançats [159]. Així, EPS8 es perfila com un bon candidat per a seguir l'evolució en el CAC.

Al llistat de gens en la recerca dels processos GO que relacionarien la inflamació amb la tumorigènesi en la comparació Ade_Con_Down vs Col_Con_Up&Down, també es va seleccionar ***Smad3*** (*SMAD family member 3*). Smad3 és activat, junt amb Smad2, per TGF β 1; posteriorment, Smad4 s'uneix a Smad2/Smad3 i es transloquen plegats al nucli de la cèl·lula, on activen la transcripció de gens relacionats amb la via TGF- β [110] [161] [162]. En l'IBD es dona un augment excessiu de Smad7, una molècula de senyalització clau que bloqueja la fosforilació de Smad3 i dificulta l'activitat supressora i antiinflamatòria de TGF- β [163]. També s'ha demostrat que la senyalització de Smad3, alterada per la inflamació crònica i eventualment per mutacions somàtiques, promou la progressió neoplàsica associada a UC [164] [165]. Per últim, hi ha evidències de la implicació de Smad3, junt amb p53 i BRCA1, en la maduració dels miRNAs [133]. Caldria doncs valorar la inclusió de Smad3 en un patró d'expressió gènica en la monitorització de pacients amb UC, per la quantitat de proteïnes que poden alterar la seva activació.

També vam seleccionar ***nrp1*** (*Neuropilin-1*; NRP1) al llistat de gens associats a tumorigènesi en la recerca per paraules clau, en concret, en buscar processos GO relacionats amb l'adhesió cel·lular, i prové del grup Col_Con_Up&Down. Codifica per una glicoproteïna transmembrana que funciona com a receptor multifactorial en el desenvolupament del sistema nerviós i del vascular [166] [167], però també ha estat associada amb un augment d'angiogènesi [167] [166] [168] [169] i creixement tumoral (suprimint l'apoptosi; s'expressa en tumors gastrointestinals com el càncer de còlon [169]) [168]. En la proliferació tumoral s'ha observat una sobreexpressió de NRP1 [169], i suposa un marcador de pronòstic [170]. Recentment també s'ha trobat que NRP1 jugaria un paper en la resposta immune: les Treg necessiten la NRP1 per regular la resposta immune antitumoral i resoldre la inflamació, i s'ha evidenciat la dependència dels Tregs intra-tumorals de la NRP1 [171]. Seria interessant, per tant, realitzar més estudis que ajudin a definir millor el paper de NRP1 en el desenvolupament de CAC i el seu valor com a possible diana [166].

El gen ***itga8*** (*integrin alpha 8*) consta al llistat de gens alterats en l'anàlisi del grup Col_Con_Up&Down, que corresponen a processos GO relacionats amb la tumorigènesi. La disminució de l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular, com les integrines, pot frenar la proliferació cel·lular [16]. De fet, s'ha trobat sobreexpressada en teixit fibròtic, com la fibrosi pulmonar [172] o la hipertròfia cardíaca [173], i disminuïda en càncers com els mielomes [174]. En l'estudi de R. Suzuki *et al*, en canvi, l'expressió de *itga8* augmenta en comparar el model murí AOM/DSS amb un grup de ratolins sans. La *itga8*, doncs, podria tenir una evolució diferent en la tumorigènesi associada a inflamació, i ser per tant un bon marcador-

El gen ***fcgr1g*** va aparèixer fins en 10 processos GO en la recerca segons paraules clau, en tots els casos el grup amb l'alteració va ser Col_Con_Up&Down: 8 GOs alterats associats amb la inflamació, i 2 GOs alterats associats amb la tumorigènesi. El FCER1 γ és un receptor de la superfamília de receptors d'immunoglobulines [175], que forma complexos proteics amb altres subunitats en cèl·lules com els macròfags (s'hi ha trobat trímers: FCER1 $\alpha\gamma_2$) [176] [175]. La immunoglobulina a la qual s'enllaça amb més afinitat és la IgE (*immunoglobulin E*), un subtipus associat a processos al·lèrgics [177]. Hi ha estudis que evidencien la implicació dels receptors FCER1 (*Fc epsilon RI*) i IgE en la susceptibilitat a patir inflamació intestinal [177]. Però mentre que els humans expressen FCER1 γ en monòcits/macròfags, eosinòfils, cèl·lules NK, mastòcits i basòfils, els ratolins només l'expressen en mastòcits i basòfils [178], fet que ha limitat la possibilitat de fer estudis sobre models animals de colitis. Tot i que els nivells d'expressió de FCER1 γ no es correlacionen amb la IgE total en sèrum, sí que estan modulats per la inflamació gastrointestinal. Segons la literatura, l'expressió de FCER1 semblaria estar regulada a nivell proteic més que en el seu mRNA [175]. El FCER1 γ s'expressa al llarg de tot el tracte digestiu, tot i que en major proporció en el còlon [175] [179]; i també s'expressa en cèl·lules epitelials del còlon de pacients amb CRC i en pacients amb inflamació intestinal [175]. Caldria, doncs, realitzar més estudis per obtenir més informació sobre la rellevància de FCER1 com a possible biomarcador.

5. Discussió

Taula 1. Relació de les funcions associades als gens d'interès seleccionats de l'estudi dels processos GO.

Funcions	<i>brca1</i>	<i>brca2</i>	<i>nbn</i>	<i>tp53</i>	<i>dock2</i>	<i>cxcl12</i>	<i>a2m</i>	<i>atf4</i>	<i>fcgr1g</i>	<i>rhov</i>	<i>smad3</i>	<i>ptk2b</i>	<i>nrp1</i>	<i>itga8</i>	<i>eps8</i>
Activació de PI3K/AKT/MAPK												✓			
Activació de RAC1					✓										
Biogènesi de miRNAs	✓										✓				
Formació d'unions intercel·lulars														✓	
Inhibició de proteases							✓								
Oncogen															
Quiniotaxis						✓									
Regulació de l'apoptosi				✓								✓	✓		
Regulació de la inflamació					✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓		
Regulació de la polaritat cel·lular										✓					
Regulació de la proliferació cel·lular	✓	✓			✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Regulació el citoesquelet												✓			
Reparació DNA	✓	✓	✓	✓											
Supressor tumoral	✓	✓		✓											
Transcripció gènica					✓			✓			✓				

5.2.2 Resposta secretora dels monòcits i funció barrera

A la literatura s'ha suggerit que en alguns casos les cèl·lules de la línia monòcit-macròfag poden presentar patrons de secreció alterats, eventualment capaços d'afectar la integritat de l'epiteli intestinal [180]. L'augment d'expressió gènica de *tlr-4* i *tlr-2* trobat en macròfags de la *lamina propria* de pacients amb IBD [35] [83] pot estar relacionat amb una eventual alteració de l'expressió de TLR en els monòcits circulants. A més, la sobreactivació de les vies dels TLRs a les cèl·lules presentadores d'antigen magnifica la producció de citocines proinflamatòries, que estimulen la diferenciació de les cèl·lules que participen en la tolerància a determinats patògens o cèl·lules canceroses (T cap a Th1, Th2, Th17, i eventualment cap a Treg) [181] [182] [183]. Certes citocines poden afectar també la permeabilitat paracel·lular i l'arquitectura de l'epiteli [181] [182] [183]. Assumint que en la UC els monòcits són atrets des de la sang perifèrica cap al còlon, al nostre estudi hem volgut analitzar fins a quin punt els monòcits de pacients de UC poden presentar un patró secretor alterat que afecti específicament la funció barrera. Per tot això es van estimular cultius de monòcits, obtinguts de pacients i d'individus sans, amb lligands deTLR2 i TLR4 i es va valorar si els sobrenedants obtinguts afectaven la barrera generada *in vitro* amb cèl·lules Caco-2. Els resultats van suggerir que els monòcits responen més marcadament als lligands de TLR-4 en malalts amb UC, alliberant mediadors que ocasionen un deteriorament més marcat de la funció barrera en relació amb la resposta dels individus sans. Per tant, existeix la possibilitat que la cronificació de la colitis, i el posterior risc de desenvolupar càncer colorectal, correspongui a la hiperactivitat de la via TLR4 en els macròfags de la *lamina propria*.

5.2.3 Cerca de poblacions leucocitàries d'interès

Els estudis amb humans estan limitats per moltes consideracions ètiques i pràctiques que inclouen: (i) la necessitat de procediments repetitius per monitoritzar la malaltia, (ii) dificultats en el control de variables com la diversitat genètica individual, el medi ambient (entorn) i la dieta, (iii) accés a pacients en estadis incipients del desenvolupament de la malaltia, (iv) dificultats en els reclutaments de pacients i voluntaris dins d'uns marges temporals acceptables, i v) el fet que cal aplicar tractaments pel control simptomàtic i que no es pot deixar cap pacient simptomàtic sense tractar. Aquests factors han contribuït a la impossibilitat de reunir el grup de pacients amb UC en remissió que portaven menys temps des del diagnòstic de la malaltia (debutants).

Amb l'estudi citomètric realitzat en el model murí volíem mimetitzar la situació que correspondria al grup de pacients en brot sense tractar. L'anàlisi quantitativa i fenotípica de les poblacions de limfòcits partint d'esplenòcits totals, han constatat variacions diferents en funció de la presència o no de tumorigènesi en animals amb inflamació (grups AD vs D). Els canvis observats en els grups D es van considerar com a variacions molt incipients en comparació amb els observats als grups AD; de manera que es van contrastar les poblacions cel·lulars en funció del nombre de cicles de DSS que han rebut cada grup d'animals, per observar els canvis poblacionals relacionats amb la inflamació crònica i amb el desenvolupament de tumors associats a colitis. El fet que els nivells de les poblacions de cèl·lules T totals, Th i Tc disminuïen progressivament als grups AD mentre que augmentaven en els grups D va suggerir el potencial interès d'aquestes poblacions com a paràmetres de seguiment en pacients amb UC amb risc de patir CAC.

En mostres de sang perifèrica d'individus sans, pacients amb UC (en remissió o en brot) o amb CRC esporàdic, van destacar uns nivells de cèl·lules Th17 i de monòcits significativament majors en pacients amb UC en brot que en remissió. De fet, altres estudis han trobat elevats els nivells de limfòcits Th17 en sang perifèrica i en infiltrats intestinals de pacients amb IBD [184] [185]. En canvi, a les anàlisis amb el model murí no es van observar variacions significativa en aquesta població cel·lular.

Per tant, l'estudi fenotípic realitzat no seria conclouent per poder establir un paral·lelisme prou important entre el model murí AOM/DSS i la patologia humana. També caldria arribar a un nombre molt més ampli de pacients per poder discriminar el valor de la població Th17 com a biomarcador en la monitorització de pacients amb UC, així com per avaluar fins a quin punt la medicació administrada als pacients afecta els patrons poblacionals que trobem.

Referències Bibliogràfiques

- [1] R. P. Bird and C. K. Good, "The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer." *Toxicol. Lett.*, vol. 112–113, pp. 395–402, Mar. 2000.
- [2] I. Okayasu, M. Yamada, T. Mikami, et al., "Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model." *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1078–83, Oct. 2002.
- [3] S. Danese and A. Mantovani, "Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer." *Oncogene*, vol. 29, no. 23, pp. 3313–23, Jun. 2010.
- [4] E. A. McLellan, A. Medline, and R. P. Bird, "Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions." *Cancer Res.*, vol. 51, no. 19, pp. 5270–4, Oct. 1991.
- [5] M. M. Taketo, "Wnt signaling and gastrointestinal tumorigenesis in mouse models." *Oncogene*, vol. 25, no. 57, pp. 7522–30, Dec. 2006.
- [6] E. Talero, S. Sánchez-Fidalgo, I. Villegas, et al., "Role of different inflammatory and tumor biomarkers in the development of ulcerative colitis-associated carcinogenesis." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 17, no. 3, pp. 696–710, Mar. 2011.
- [7] R. J. Yamulla, E. G. Kane, A. E. Moody, et al., "Testing Models of the APC Tumor Suppressor/ β -catenin Interaction Reshapes Our View of the Destruction Complex in Wnt Signaling." *Genetics*, Jun. 2014.
- [8] K. Guda, M. B. Upender, G. Belinsky, et al., "Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability." *Oncogene*, vol. 23, no. 21, pp. 3813–21, May 2004.
- [9] H. Clevers and R. Nusse, "Wnt/ β -catenin signaling and disease." *Cell*, vol. 149, no. 6, pp. 1192–205, Jun. 2012.
- [10] N. Yamada, S. Noguchi, T. Mori, et al., "Tumor-suppressive microRNA-145 targets catenin δ -1 to regulate Wnt/ β -catenin signaling in human colon cancer cells." *Cancer Lett.*, vol. 335, no. 2, pp. 332–42, Jul. 2013.
- [11] K. Huang, J.-X. Zhang, L. Han, et al., "MicroRNA roles in beta-catenin pathway." *Mol. Cancer*, vol. 9, no. Table 1, p. 252, Jan. 2010.
- [12] T. Sourisseau, A. Georgiadis, A. Tsapara, et al., "Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA." *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 2387–98, Mar. 2006.
- [13] S. Markowitz, "TGF-beta receptors and DNA repair genes, coupled targets in a pathway of human colon carcinogenesis." *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1470, no. 1, pp. M13–20, Feb. 2000.
- [14] F. A. Oberhammer, M. Pavelka, S. Sharma, et al., "Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 12, pp. 5408–12, Jun. 1992.

- [15] C. Y. Wang, J. R. Eshleman, J. K. Willson, et al., "Both transforming growth factor-beta and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line." *Cancer Res.*, vol. 55, no. 21, pp. 5101–5, Nov. 1995.
- [16] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer" *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [17] I. Thorup, "Histomorphological and immunohistochemical characterization of colonic aberrant crypt foci in rats: relationship to growth factor expression." *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 3, pp. 465–72, Mar. 1997.
- [18] L. A. J. O'Neill, "How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know." *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 3–9, Feb. 2006.
- [19] M. Fukata, A. Chen, A. S. Vamadevan, et al., "Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors." *Gastroenterology*, vol. 133, no. 6, pp. 1869–81, Dec. 2007.
- [20] M. Fukata and M. T. Abreu, "Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies." *Oncogene*, vol. 27, no. 2, pp. 234–43, Jan. 2008.
- [21] S. R. Quinn and L. a O'Neill, "A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling." *Int. Immunol.*, vol. 23, no. 7, pp. 421–5, Jul. 2011.
- [22] E. L. Lowe, T. R. Crother, S. Rabizadeh, et al., "Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer." *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e13027, Jan. 2010.
- [23] O. Boulard, M. J. Asquith, F. Powrie, et al., "TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation." *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 2, pp. 516–24, Feb. 2010.
- [24] E. Cario and D. K. Podolsky, "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 12, pp. 7010–7, Dec. 2000.
- [25] D. a Sussman, R. Santaolalla, P. a Bejarano, et al., "In silico and Ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer." *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 33, no. 1, p. 45, 2014.
- [26] J. Lee, J.-H. Mo, K. Katakura, et al., "Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells" *Nat Cell Biol*, vol. 8, no. 12, pp. 1327–1336, Dec. 2006.
- [27] F. Sánchez-Muñoz, G. Fonseca-Camarillo, M. A. Villeda-Ramírez, et al., "Transcript levels of Toll-Like Receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in Ulcerative Colitis." *BMC Gastroenterol.*, vol. 11, p. 138, Jan. 2011.
- [28] A. Dunne and L. A. J. O'Neill, "Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity." *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 15, pp. 3330–5, Jun. 2005.
- [29] S. Rakoff-Nahoum and R. Medzhitov, "Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88." *Science*, vol. 317, no. 5834, pp. 124–7, Jul. 2007.

5. Discussió

- [30] H. Xiao, M. F. Gulen, J. Qin, et al., "The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis." *Immunity*, vol. 26, no. 4, pp. 461–75, Apr. 2007.
- [31] N. J. Gay, M. F. Symmons, M. Gangloff, et al., "Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes" *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 8, pp. 546–558, Jul. 2014.
- [32] F. Sandor and M. Buc, "Toll-like receptors. III. Biological significance and impact for human medicine." *Folia Biol. (Praha)*, vol. 51, no. 6, pp. 198–203, Jan. 2005.
- [33] Naugler, "NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms." *Curr Opin Genet Dev*, vol. 18, no. 1, pp. 19–26, 2009.
- [34] C. Garlanda, H.-J. Anders, and A. Mantovani, "TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization." *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 9, pp. 439–46, Sep. 2009.
- [35] M. T. Abreu, M. Fukata, and M. Arditi, "TLR signaling in the gut in health and disease." *J. Immunol.*, vol. 174, no. 8, pp. 4453–60, Apr. 2005.
- [36] L. Dubuquoy, E. Å. Jansson, S. Deeb, et al., "Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis" *Gastroenterology*, vol. 124, no. 5, pp. 1265–1276, May 2003.
- [37] M. Kanneganti, M. Mino-Kenudson, and E. Mizoguchi, "Animal models of colitis-associated carcinogenesis." *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 342637, Jan. 2011.
- [38] A. Strillacci, C. Griffoni, P. Sansone, et al., "MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells." *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 8, pp. 1439–47, May 2009.
- [39] F. H. Sarkar, S. Adsule, Y. Li, et al., "Back to the future: COX-2 inhibitors for chemoprevention and cancer therapy." *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 7, no. 6, pp. 599–608, Jun. 2007.
- [40] F. A. Sinicrope and S. Gill, "Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer." *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 23, no. 1–2, pp. 63–75, 2004.
- [41] T.-O. Ishikawa and H. R. Herschman, "Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression." *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 4, pp. 729–36, Apr. 2010.
- [42] M. Fukata, A. Chen, A. Klepper, et al., "Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine." *Gastroenterology*, vol. 131, no. 3, pp. 862–77, Sep. 2006.
- [43] Y. Sun, X. M. Tang, E. Half, et al., "Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells." *Cancer Res.*, vol. 62, no. 21, pp. 6323–8, Nov. 2002.
- [44] T. Moldoveanu, A. V. Follis, R. W. Kriwacki, et al., "Many players in BCL-2 family affairs." *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 101–111, Mar. 2014.

- [45] O. Slaby, M. Svoboda, J. Michalek, et al., "MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application." *Mol. Cancer*, vol. 8, p. 102, Jan. 2009.
- [46] B. P. Lewis, I. Shih, M. W. Jones-Rhoades, et al., "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell*, vol. 115, no. 7, pp. 787–98, Dec. 2003.
- [47] M. Fasseu, X. Tréton, C. Guichard, et al., "Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease." *PLoS One*, vol. 5, no. 10, Jan. 2010.
- [48] R. Nagel, C. le Sage, B. Diosdado, et al., "Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer." *Cancer Res.*, vol. 68, no. 14, pp. 5795–802, Jul. 2008.
- [49] M. Katoh and M. Katoh, "Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades." *Cancer Biol. Ther.*, vol. 5, no. 9, pp. 1059–64, Sep. 2006.
- [50] P. Buongiorno, V. V. Pethe, G. S. Charames, et al., "Rac1 GTPase and the Rac1 exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer cells." *Mol. Cancer*, vol. 7, p. 73, Jan. 2008.
- [51] Y. Li, Y. Shao, Y. Tong, et al., "Nucleo-cytoplasmic shuttling of PAK4 modulates β -catenin intracellular translocation and signaling." *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1823, no. 2, pp. 465–75, Feb. 2012.
- [52] N. K. Noren, B. P. Liu, K. Burrridge, et al., "p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases." *J. Cell Biol.*, vol. 150, no. 3, pp. 567–80, Aug. 2000.
- [53] Z. Wang, X. Zhang, Z. Yang, et al., "MiR-145 regulates PAK4 via the MAPK pathway and exhibits an antitumor effect in human colon cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 427, no. 3, pp. 444–9, Oct. 2012.
- [54] A. E. Dart and C. M. Wells, "P21-activated kinase 4--not just one of the PAK." *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 92, no. 4–5, pp. 129–38, 2013.
- [55] R. Sancho, A. S. Nateri, A. G. de Vinuesa, et al., "JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumorigenesis in mice." *EMBO J.*, vol. 28, no. 13, pp. 1843–54, Jul. 2009.
- [56] C. L. Cottonham, S. Kaneko, and L. Xu, "miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells." *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 46, pp. 35293–302, Nov. 2010.
- [57] I. de Krijger, L. J. M. Mekenkamp, C. J. a Punt, et al., "MicroRNAs in colorectal cancer metastasis." *J. Pathol.*, vol. 224, no. 4, pp. 438–47, Aug. 2011.
- [58] N. Xu, T. Papagiannakopoulos, G. Pan, et al., "MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells." *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 647–658, May 2009.

5. Discussió

- [59] K. Brennan, G. Offiah, E. A. McSherry, et al., "Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer?" *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, p. 460607, Jan. 2010.
- [60] D. Löffler, K. Brocke-Heidrich, G. Pfeifer, et al., "Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer." *Blood*, vol. 110, no. 4, pp. 1330–3, Aug. 2007.
- [61] H. Allgayer, "Pdcd4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA." *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 73, no. 3, pp. 185–91, Mar. 2010.
- [62] V. M. Golubovskaya, "Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials" *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 19, pp. 687–706, Jan. 2014.
- [63] K. R. Groschwitz and S. P. Hogan, "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 124, no. 1, pp. 3–20; quiz 21–2, Jul. 2009.
- [64] J. M. Mullin, "Epithelial barriers, compartmentation, and cancer." *Sci. STKE*, vol. 2004, no. 216, p. pe2, Jan. 2004.
- [65] W. P. Bishop and J. T. Wen, "Regulation of Caco-2 cell proliferation by basolateral membrane epidermal growth factor receptors." *Am. J. Physiol.*, vol. 267, no. 5 Pt 1, pp. G892–900, Nov. 1994.
- [66] O. a Ebner and M. Selbach, "Quantitative proteomic analysis of gene regulation by miR-34a and miR-34c." *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e92166, Jan. 2014.
- [67] M. C. Guadamillas, A. Cerezo, and M. a Del Pozo, "Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer." *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 19, pp. 3189–97, Oct. 2011.
- [68] L.-N. Yu, Q.-L. Zhang, X. Li, et al., "Tiam1 transgenic mice display increased tumor invasive and metastatic potential of colorectal cancer after 1,2-dimethylhydrazine treatment." *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e73077, Jan. 2013.
- [69] N. A. Mack and M. Georgiou, "The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity." *Small GTPases*, vol. 5, no. 2, pp. 1–16, Dec. 2014.
- [70] M. S. Balda and K. Matter, "Tight junctions at a glance." *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. Pt 22, pp. 3677–82, Nov. 2008.
- [71] I. K. H. Poon, C. D. Lucas, A. G. Rossi, et al., "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential." *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 3, pp. 166–80, Mar. 2014.
- [72] C. Faber, T. Kirchner, and F. Hlubek, "The impact of microRNAs on colorectal cancer." *Virchows Arch.*, vol. 454, no. 4, pp. 359–67, Apr. 2009.
- [73] G. A. Calin and C. M. Croce, "MicroRNA signatures in human cancers" *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 857–866, Nov. 2006.
- [74] P. Brandtzaeg, G. Haraldsen, and J. Rugtveit, "Immunopathology of human inflammatory bowel disease." *Springer Semin. Immunopathol.*, vol. 18, no. 4, pp. 555–89, Jan. 1997.

- [75] F. J. Sheedy, E. Palsson-McDermott, E. J. Hennessy, et al., "Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21." *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 2, pp. 141–7, Feb. 2010.
- [76] X. Ma, L. E. Becker Buscaglia, J. R. Barker, et al., "MicroRNAs in NF-kappaB signaling." *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 159–66, Jun. 2011.
- [77] I. A. Asangani, S. A. K. Rasheed, D. a Nikolova, et al., "MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer" *Oncogene*, vol. 27, no. 15, pp. 2128–2136, Oct. 2008.
- [78] M. L. Squadrito, M. Etzrodt, M. De Palma, et al., "MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer." *Trends Immunol.*, pp. 1–10, Mar. 2013.
- [79] R. M. O'Connell, D. S. Rao, and D. Baltimore, "microRNA regulation of inflammatory responses." *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 295–312, Jan. 2012.
- [80] R. T. Marquez, E. Wendlandt, C. S. Galle, et al., "MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF- B signaling" *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 298, no. 28, pp. 535–541, Apr. 2010.
- [81] S. Carpenter and L. A. J. O'Neill, "Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins." *Biochem. J.*, vol. 422, no. 1, pp. 1–10, Aug. 2009.
- [82] W. Jin, M. Chang, and S.-C. Sun, "Peli: a family of signal-responsive E3 ubiquitin ligases mediating TLR signaling and T-cell tolerance." *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 9, no. 2, pp. 113–22, Mar. 2012.
- [83] G. Harris, R. KuoLee, and W. Chen, "Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract." *World J. Gastroenterol.*, vol. 12, no. 14, pp. 2149–60, Apr. 2006.
- [84] B. Guleng, Y.-M. Lian, and J.-L. Ren, "Mindin is upregulated during colitis and may activate NF-kappaB in a TLR-9 mediated manner." *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 9, pp. 1070–5, Mar. 2010.
- [85] J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V Iyer, et al., "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 4604–13, Sep. 1996.
- [86] D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, et al., "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science*, vol. 246, no. 4935, pp. 1306–9, Dec. 1989.
- [87] K. H. Plate, G. Breier, H. A. Weich, et al., "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature*, vol. 359, no. 6398, pp. 845–8, Oct. 1992.
- [88] Q. Xu, L.-Z. Liu, X. Qian, et al., "MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis." *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 761–74, Jan. 2012.

5. Discussió

- [89] J. Jantsch, K. J. Binger, D. N. Müller, et al., "Macrophages in homeostatic immune function." *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 146, Jan. 2014.
- [90] V. Cortez-Retamozo, M. Etzrodt, and M. J. Pittet, "Regulation of macrophage and dendritic cell responses by their lineage precursors." *J. Innate Immun.*, vol. 4, no. 5–6, pp. 411–23, Jan. 2012.
- [91] J. N. Bottsford-Miller, R. L. Coleman, and A. K. Sood, "Resistance and escape from antiangiogenesis therapy: clinical implications and future strategies." *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 32, pp. 4026–34, Nov. 2012.
- [92] M. Yukawa, M. Iizuka, Y. Horie, et al., "Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis." *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 17, no. 2, pp. 70–6, Mar. 2002.
- [93] E. R. Fearon and B. Vogelstein, "A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis" *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759–67, Jun. 1990.
- [94] H. Hermeking, "p53 enters the microRNA world." *Cancer Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 414–8, Nov. 2007.
- [95] P. R. Nambiar, C. Giardina, K. Guda, et al., "Role of the Alternating Reading Frame (P19) -p53 Pathway in an in Vivo Murine Colon Tumor Model Role of the Alternating Reading Frame (P19) -p53 Pathway in an in Vivo Murine" pp. 3667–3674, 2002.
- [96] T. Tanaka, H. Kohno, R. Suzuki, et al., "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." *Cancer Sci.*, vol. 94, no. 11, pp. 965–73, Nov. 2003.
- [97] H. Tazawa, N. Tsuchiya, M. Izumiya, et al., "Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 39, pp. 15472–7, Sep. 2007.
- [98] A. D. Boiko, S. Porteous, O. V. Razorenova, et al., "A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation." *Genes Dev.*, vol. 20, no. 2, pp. 236–52, Jan. 2006.
- [99] G. T. Bommer, I. Gerin, Y. Feng, et al., "p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes." *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 15, pp. 1298–307, Aug. 2007.
- [100] D. Z. Ye and J. Field, "PAK signaling in cancer." *Cell. Logist.*, vol. 2, no. 2, pp. 105–116, Apr. 2012.
- [101] T. Schepeler, J. T. Reinert, M. S. Ostefeld, et al., "Diagnostic and Prognostic MicroRNAs in Stage II Colon Cancer Diagnostic and Prognostic MicroRNAs in Stage II Colon Cancer" *Cancer Res.*, vol. 68, no. 15, pp. 6416–6424, Aug. 2008.
- [102] B. B. McConnell and V. W. Yang, "Mammalian Kru " ppeL-like Factors in Health and Diseases" no. 361, pp. 1337–1381, 2010.
- [103] Z. J. Zhang and S. L. Ma, "miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review)." *Oncol. Rep.*, vol. 27, no. 4, pp. 903–10, May 2012.

- [104] S. Wang, C. Bian, Z. Yang, et al., "miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN." *Int. J. Oncol.*, vol. 34, no. 5, pp. 1461–6, May 2009.
- [105] W. Aizu, G. S. Belinsky, C. Flynn, et al., "Circumvention and reactivation of the p53 oncogene checkpoint in mouse colon tumors." *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, no. 8, pp. 981–91, Oct. 2006.
- [106] F. Sun, H. Fu, Q. Liu, et al., "Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest." *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 10, pp. 1564–8, Apr. 2008.
- [107] T. Wang, L. Zhang, C. Shi, et al., "TGF- β -induced miR-21 negatively regulates the antiproliferative activity but has no effect on EMT of TGF- β in HaCaT cells." *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 2, pp. 366–76, Feb. 2012.
- [108] G. Liu, A. Friggeri, Y. Yang, et al., "miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis." *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 8, pp. 1589–97, Aug. 2010.
- [109] R. T. Marquez, S. Bandyopadhyay, E. B. Wendlandt, et al., "Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans." *Lab. Invest.*, vol. 90, no. 12, pp. 1727–36, Dec. 2010.
- [110] S. K. Halder, G. Rachakonda, N. G. Deane, et al., "Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer." *Br. J. Cancer*, vol. 99, no. 6, pp. 957–65, Sep. 2008.
- [111] G. Caderni, D. Palli, L. Lancioni, et al., "Dietary determinants of colorectal proliferation in the normal mucosa of subjects with previous colon adenomas." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 8, no. 3, pp. 219–25, Mar. 1999.
- [112] W. Du, J. Hong, Y.-C. Wang, et al., "Inhibition of JAK2/STAT3 signalling induces colorectal cancer cell apoptosis via mitochondrial pathway." *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 16, no. 8, pp. 1878–88, Aug. 2012.
- [113] Y. Li, C. de Haar, M. Chen, et al., "Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis." *Gut*, vol. 59, no. 2, pp. 227–35, Feb. 2010.
- [114] E. C. Wick, R. E. LeBlanc, G. Ortega, et al., "Shift from pStat6 to pStat3 predominance is associated with inflammatory bowel disease-associated dysplasia." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 18, no. 7, pp. 1267–74, Jul. 2012.
- [115] S. Grivennikov, E. Karin, J. Terzic, et al., "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." *Cancer Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 103–13, Feb. 2009.
- [116] D. Iliopoulos, S. a Jaeger, H. a Hirsch, et al., "STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer." *Mol. Cell*, vol. 39, no. 4, pp. 493–506, Aug. 2010.
- [117] M. J. Rosen, M. R. Frey, M. K. Washington, et al., "STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 17, no. 11, pp. 2224–34, Dec. 2011.
- [118] B. H. Li, X. Z. Yang, P. D. Li, et al., "IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 369, no. 2, pp. 554–60, May 2008.

5. Discussió

- [119] A. Sica and V. Bronte, "Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development." *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 5, pp. 1155–66, May 2007.
- [120] Y. Yin, Z.-P. Yan, N.-N. Lu, et al., "Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1." *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1829, no. 2, pp. 239–47, Feb. 2013.
- [121] J. R. Pekow, U. Dougherty, R. Mustafi, et al., "miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 94–100, Jan. 2012.
- [122] S. Pechlivanis, B. Pardini, J. L. Bermejo, et al., "Insulin pathway related genes and risk of colorectal cancer: INSR promoter polymorphism shows a protective effect." *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 733–40, Sep. 2007.
- [123] G. La Rocca, M. Badin, B. Shi, et al., "Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway." *J. Cell. Physiol.*, vol. 220, no. 2, pp. 485–91, Aug. 2009.
- [124] D. L. Knowlton, K. Tang, P. V Henstock, et al., "miRNA Alterations Modify Kinase Activation In The IGF-1 Pathway And Correlate With Colorectal Cancer Stage And Progression In Patients." *J. Cancer*, vol. 2, pp. 490–502, Jan. 2011.
- [125] I. Ahmed, B. Roy, P. Chandrakesan, et al., "Evidence of functional cross talk between the Notch and NF- κ B pathways in nonneoplastic hyperproliferating colonic epithelium." *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 304, no. 4, pp. G356–70, Feb. 2013.
- [126] M. Gerstung, N. Eriksson, J. Lin, et al., "The temporal order of genetic and pathway alterations in tumorigenesis." *PLoS One*, vol. 6, no. 11, p. e27136, Jan. 2011.
- [127] J. T. Chang, C. Carvalho, S. Mori, et al., "A genomic strategy to elucidate modules of oncogenic pathway signaling networks." *Mol. Cell*, vol. 34, no. 1, pp. 104–14, Apr. 2009.
- [128] W. Zhao, L. Qi, Y. Qin, et al., "Functional comparison between genes dysregulated in ulcerative colitis and colorectal carcinoma." *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71989, Jan. 2013.
- [129] L. M. Butler, P. J. Hewett, W. J. Butler, et al., "Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement." *Br. J. Cancer*, vol. 77, no. 9, pp. 1454–9, May 1998.
- [130] C. Meyer, A. Brieger, G. Plotz, et al., "An interstitial deletion at 3p21.3 results in the genetic fusion of MLH1 and ITGA9 in a Lynch syndrome family." *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 762–9, Feb. 2009.
- [131] C. R. Boland, M. G. Luciani, C. Gasche, et al., "INFECTION, INFLAMMATION, AND GASTROINTESTINAL CANCER" *Gut*, vol. 54, no. 9, pp. 1321–31, Sep. 2005.
- [132] S. P. Hussain and C. C. Harris, "Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials." *Int. J. Cancer*, vol. 121, no. 11, pp. 2373–80, Dec. 2007.
- [133] S. Kawai and A. Amano, "BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex." *J. Cell Biol.*, vol. 197, no. 2, pp. 201–8, Apr. 2012.

- [134] H. I. Suzuki, K. Yamagata, K. Sugimoto, et al., "Modulation of microRNA processing by p53." *Nature*, vol. 460, no. 7254, pp. 529–33, Jul. 2009.
- [135] P. Garre, L. Martín, J. Sanz, et al., "BRCA2 gene: a candidate for clinical testing in familial colorectal cancer type X." *Clin. Genet.*, May 2014.
- [136] C. M. Phelan, J. Iqbal, H. T. Lynch, et al., "Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study." *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 2, pp. 530–4, Jan. 2014.
- [137] V. Sopik, C. Phelan, C. Cybulski, et al., "BRCA1 and BRCA2 mutations and the risk for colorectal cancer." *Clin. Genet.*, Sep. 2014.
- [138] J. Wang, L. Liu, H. Qiu, et al., "Ursolic acid simultaneously targets multiple signaling pathways to suppress proliferation and induce apoptosis in colon cancer cells." *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e63872, Jan. 2013.
- [139] S. Mikami, H. Nakase, S. Yamamoto, et al., "Blockade of CXCL12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 327, no. 2, pp. 383–92, Nov. 2008.
- [140] V. Oliveira Frick, C. Rubie, P. Ghadjar, et al., "Changes in CXCL12/CXCR4-chemokine expression during onset of colorectal malignancies." *Tumour Biol.*, vol. 32, no. 1, pp. 189–96, Feb. 2011.
- [141] J. Terzić, S. Grivennikov, E. Karin, et al., "Inflammation and colon cancer." *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2101–2114.e5, Jun. 2010.
- [142] B. Ruffell, N. I. Affara, and L. M. Coussens, "Differential macrophage programming in the tumor microenvironment." *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 3, pp. 119–26, Mar. 2012.
- [143] A. Mantovani, S. K. Biswas, M. R. Galdiero, et al., "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." *J. Pathol.*, vol. 229, no. 2, pp. 176–85, Jan. 2013.
- [144] E. Mocchegiani, R. Giacconi, and L. Costarelli, "Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications." *Curr. Opin. Pulm. Med.*, vol. 17 Suppl 1, pp. S11–9, Dec. 2011.
- [145] C.-S. Ang, J. Rothacker, H. Patsiouras, et al., "Murine fecal proteomics: a model system for the detection of potential biomarkers for colorectal cancer." *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 19, pp. 3330–40, May 2010.
- [146] T. Fujita, A. Nagayama, and S. Anazawa, "Circulating alpha-2-macroglobulin levels and depression scores in patients who underwent abdominal cancer surgery" *J. Surg. Res.*, vol. 114, no. 1, pp. 90–94, Sep. 2003.
- [147] H. Zeng and J. H. Botnen, "Selenium is critical for cancer-signaling gene expression but not cell proliferation in human colon Caco-2 cells." *Biofactors*, vol. 31, no. 3–4, pp. 155–64, Jan. 2007.
- [148] A. DeStefano and M. Hoffman, "The effect of alpha 2 macroglobulin-proteinase complexes on macrophage Ia expression in vivo." *Immunol. Invest.*, vol. 20, no. 1, pp. 33–43, Feb. 1991.

5. Discussió

- [149] M. Hoffman, S. V. Pizzo, and J. B. Weinberg, "Alpha 2 macroglobulin-proteinase complexes stimulate prostaglandin E2 synthesis by peritoneal macrophages." *Agents Actions*, vol. 25, no. 3–4, pp. 360–7, Dec. 1988.
- [150] D. J. Brown, J. A. Khan, G. Copeland, et al., "Alpha 2-macroglobulin in patients with inflammatory bowel disease." *J. Clin. Lab. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 53–7, Jul. 1980.
- [151] M. Katoh and M. Katoh, "Comparative integromics on FZD7 orthologs: conserved binding sites for PU.1, SP1, CCAAT-box and TCF/LEF/SOX transcription factors within 5'-promoter region of mammalian FZD7 orthologs." *Int. J. Mol. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 529–33, Mar. 2007.
- [152] Y. Katoh and M. Katoh, "Conserved POU-binding site linked to SP1-binding site within FZD5 promoter: Transcriptional mechanisms of FZD5 in undifferentiated human ES cells, fetal liver/spleen, adult colon, pancreatic islet, and diffuse-type gastric cancer" *Int. J. Oncol.*, vol. 30, no. 3, pp. 751–755, Mar. 2007.
- [153] S. Bhattacharyya, A. Borthakur, P. K. Dudeja, et al., "Carrageenan reduces bone morphogenetic protein-4 (BMP4) and activates the Wnt/beta-catenin pathway in normal human colonocytes." *Dig. Dis. Sci.*, vol. 52, no. 10, pp. 2766–74, Oct. 2007.
- [154] H. Kirikoshi and M. Katoh, "Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer." *Int. J. Oncol.*, vol. 21, no. 4, pp. 895–900, Oct. 2002.
- [155] H. Kirikoshi and M. Katoh, "Expression of WRCH1 in human cancer and down-regulation of WRCH1 by β -estradiol in MCF-7 cells" *Int. J. Oncol.*, vol. 20, no. 4, pp. 777–83, Apr. 2002.
- [156] X. Li, R. C. Dy, W. G. Cance, et al., "Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: Calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase" *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 13, pp. 8917–8924, 1999.
- [157] X. Li, D. Hunter, J. Morris, et al., "Communication A Calcium-dependent Tyrosine Kinase Splice Variant in Human" pp. 9361–9364, 1998.
- [158] J. M. Watson, T. W. Harding, V. Golubovskaya, et al., "Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility." *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 5, pp. 3536–42, Feb. 2001.
- [159] Y.-H. Li, T.-Y. Xue, Y.-Z. He, et al., "Novel oncoprotein EPS8: a new target for anticancer therapy." *Future Oncol.*, vol. 9, no. 10, pp. 1587–94, Oct. 2013.
- [160] W. M. Abdel-Rahman, S. Ruosaari, S. Knuutila, et al., "Differential roles of EPS8 in carcinogenesis: loss of protein expression in a subset of colorectal carcinoma and adenoma." *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 29, pp. 3896–903, Aug. 2012.
- [161] E. R. Fearon, "Molecular genetics of colorectal cancer." *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 6, pp. 479–507, Jan. 2011.
- [162] D. C. Chung, "The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis" *Gastroenterology*, vol. 119, no. 3, pp. 854–65, Sep. 2000.

- [163] M. À. Gassull, F. Gomollón, and J. Hinojosa, *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd ed. Madrid, Spain: Arán Ediciones, S.L., 2007.
- [164] S. Kawamata, K. Matsuzaki, M. Murata, et al., "Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis." *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 17, no. 3, pp. 683–95, Mar. 2011.
- [165] A. Seamons, P. M. Treuting, T. Brabb, et al., "Characterization of Dextran Sodium Sulfate-Induced Inflammation and Colonic Tumorigenesis in Smad3 (-/-) Mice with Dysregulated TGF β ." *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e79182, Jan. 2013.
- [166] C. D. Weekes, M. Beeram, A. W. Tolcher, et al., "A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors." *Invest. New Drugs*, vol. 32, no. 4, pp. 653–60, Aug. 2014.
- [167] A. M. Jubb, L. A. Strickland, S. D. Liu, et al., "Neuropilin-1 expression in cancer and development." *J. Pathol.*, vol. 226, no. 1, pp. 50–60, Jan. 2012.
- [168] B. Chaudhary and E. Elkord, "Novel expression of Neuropilin 1 on human tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases" pp. 1–15, 2014.
- [169] C. A. Staton, I. Koay, J. M. Wu, et al., "Neuropilin-1 and neuropilin-2 expression in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal cancer." *Histopathology*, vol. 62, no. 6, pp. 908–15, May 2013.
- [170] T. Kamiya, T. Kawakami, Y. Abe, et al., "The preserved expression of neuropilin (NRP) 1 contributes to a better prognosis in colon cancer" *Oncol. Rep.*, vol. 15, no. 2, pp. 369–73, Feb. 2006.
- [171] G. M. Delgoffe, S.-R. Woo, M. E. Turnis, et al., "Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis." *Nature*, vol. 501, no. 7466, pp. 252–6, Sep. 2013.
- [172] A. T. Ooi, S. Ram, A. Kuo, et al., "Identification of an interleukin 13-induced epigenetic signature in allergic airway inflammation." *Am. J. Transl. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 219–28, Jan. 2012.
- [173] E. W. Daw, S. N. Chen, G. Czernuszewicz, et al., "Genome-wide mapping of modifier chromosomal loci for human hypertrophic cardiomyopathy." *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 20, pp. 2463–71, Oct. 2007.
- [174] M. Bolzoni, P. Storti, S. Bonomini, et al., "Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules." *Exp. Hematol.*, vol. 41, no. 4, pp. 387–97.e1, Apr. 2013.
- [175] C. Bannert, B. Bidmon-Fliegenschnee, G. Stary, et al., "Fc-epsilon-RI, the high affinity IgE-receptor, is robustly expressed in the upper gastrointestinal tract and modulated by mucosal inflammation." *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e42066, Jan. 2012.
- [176] S. Kanowith-Klein, F. Hofman, and A. Saxon, "Expression of Fc epsilon receptors and surface and cytoplasmic IgE on human fetal and adult lymphopoietic tissue." *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 48, no. 2, pp. 214–24, Aug. 1988.

5. Discussió

- [177] D. Dombrowicz, S. Nutten, P. Desreumaux, et al., "Role of the high affinity immunoglobulin E receptor in bacterial translocation and intestinal inflammation." *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 1, pp. 25–34, 2001.
- [178] M. Maeda, C. Carpenito, R. C. Russell, et al., "Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation." *J. Immunol.*, vol. 175, no. 7, pp. 4426–32, Oct. 2005.
- [179] C. P. Liu, R. Ueda, J. She, et al., "Abnormal T cell development in CD3-zeta-/- mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine." *EMBO J.*, vol. 12, no. 12, pp. 4863–75, Dec. 1993.
- [180] E. Cantó, E. Ricart, D. Monfort, et al., "TNF α production to TLR2 ligands in active IBD patients" *Clin. Immunol.*, vol. 119, pp. 156–165, 2006.
- [181] W. W. C. van Maren, J. F. M. Jacobs, I. J. M. de Vries, et al., "Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress?" *Immunology*, vol. 124, no. 4, pp. 445–52, Aug. 2008.
- [182] R.-F. Wang, Y. Miyahara, and H. Y. Wang, "Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy." *Oncogene*, vol. 27, no. 2, pp. 181–9, Jan. 2008.
- [183] A. Szkaradkiewicz, R. Marciniak, I. Chudzicka-Strugała, et al., "Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients." *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 57, no. 4, pp. 291–4, Jan..
- [184] M. G. Kattah, M. T. Wong, M. D. Yocum, et al., "Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells." *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 6, pp. 1619–29, Jun. 2008.
- [185] M. a Kleinschek, K. Boniface, S. Sadekova, et al., "Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation." *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 3, pp. 525–34, Mar. 2009.

6 Conclusions

Conclusions

Els estudis realitzats han permès extraure les següents conclusions:

1. El model murí AOM/DSS escollit permet fer un seguiment dels efectes que provoquen els brots inflamatoris sobre la progressió de lesions causades per l'administració d'un agent mutagen com l'AOM. Les lesions trobades en el còlon de ratolins que han rebut l'agent mutagen i pateixen diversos episodis de colitis induïda per DSS, són inflamació, hiperplàsia, adenomes i adenocarcinomes, mentre que en absència d'episodis inflamatoris només s'observen adenomes, i en un nombre molt inferior.

2. En ratolins, la reiteració d'episodis de colitis causada per DSS en l'aigua de beguda determina l'aparició d'inflamació i hiperplàsia macroscòpiques, i adenomes encara microscòpics.

3. A l'estudi histològic dels còlons dels ratolins, el paràmetre que presenta més diferències entre els diferents grups, és el nombre de focus de criptes aberrants, i és, per tant, el que té un valor discriminatori més elevat. En animals que reben AOM i DSS, s'observen dos períodes en els quals s'agregen particularment les lesions del còlon: entre el tercer i el sisè cicle de DSS. En canvi, en els animals que no han rebut l'agent mutagen, les primeres lesions displàsiques apareixen entre el sisè i el novè episodi colíctic. La major part dels canvis observats correlacionen directament l'augment del nombre de cicles de DSS amb una major inflamació, una major proliferació cel·lular i un major nombre de lesions precanceroses.

4. Els tumors que apareixen en un context inflamatori presenten alteracions significatives en l'expressió dels gens *tlr4*, *tlr9*, *cnnd1*, *cox2* i *bcl2*, mentre que l'expressió de *tlr2*, *myd88* i *tgfb1* no es modifica significativament. Això suggereix una implicació de *tlr4*, *tlr9*, *cnnd1*, *cox2* i *bcl2* en el desenvolupament tumoral.

5. La hiperactivació de TLR4 i la disminució de l'expressió de TLR9 poden estar vinculades, contribuint a la pèrdua de l'homeòstasi en l'epiteli del còlon inflamat.

6. En els tumors colònics dels animals AOM/DSS s'evidencia una disminució significativa de l'expressió de *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145*, i *miR-34a*, fet que condicionarà un increment d'expressió de les seves dianes. La utilització d'eines bioinformàtiques i la recerca bibliogràfica han permès seleccionar les dianes d'interès per la seva relació amb els processos de proliferació, inflamació, apoptosi, angiogènesi i organització tissular.

7. Les acumulacions citoplasmàtica i nuclear de β -catenina evidenciades immunohistoquímicament concorden amb l'alteració dels *miR-135a*, *miR-21*, *miR-145* i *miR-34a*; la reducció dels nivells d'aquests miRNAs afecta la sobreexpressió de diversos elements capaços de provocar una hiperactivació de la via canònica Wnt i de l'AKT1, i la dissociació del complex E-cadherina/ α -catenina/ β -catenina. Les acumulacions de β -catenina, i l'alteració dels miRNAs estudiats, indiquen canvis que

6. Conclusions

comportarien una major activació de processos proliferatius en els tumors de còlon associats a inflamació.

8. Les dianes PTK2 (de miR-135a) i WNT1 (de miR-34a) es perfilen com a possibles responsables de l'acumulació citosòlica de β -catenina que s'ha observat en teixits que presentaven proliferació i displàsia. Suggerim que PAK4 i p120, dianes de miR-145, contribueixen a la translocació aberrant de la β -catenina cap al nucli.

9. TIAM i STAT3, dianes de miR-21, són d'especial interès com a marcadors d'evolució, ja que actuen com a reguladors positius de la transcripció de gens diana de la via Wnt. Una sobreexpressió de *tiam1* i *vcl*, associades a la disminució de l'expressió de miR-21 i miR-34a respectivament, a més d'afavorir la transcripció de gens de la via Wnt pot propiciar l'alteració de l'arquitectura tissular de còlon inflammat, ja són elements que intervenen en el manteniment dels complexos proteics que formen les TJs de l'epiteli. El seguiment de *tiam1* i *vcl* poden tenir interès per a monitoritzar la transició colitis-càncer.

10. El balanç apoptosi-proliferació es pot veure desequilibrat per la sobreexpressió de *birc5* i *btg2*, dianes de miR-145 i miR-21 respectivament, que són inhibidors de l'expressió del supressor tumoral *p53*. El seguiment de l'expressió de *birc5* i de *btg2* poden ser útils com indicadors de progressió tumoral.

11. Tot i la disminució dels nivells d'expressió del factor antiapoptòtic Bcl-2 en els tumors del grup AD, la resistència a l'apoptosi en el teixit tumoral podria estar mediada per PAK4, KLF4 i RTKN, dianes de miR-145. La inhibició farmacològica d'aquests elements pot tenir interès com a mecanisme per a frenar la tumorigènesi.

12. Altres dianes d'interès putatiu són: Peli1 (diana de miR-21), relacionada amb la regulació de la via de senyalització dels TLRs; ANG2 i HIF-1 α (dianes de miR-145), implicades en la potenciació de l'angiogènesi; SMAD3 i IRS-1 (dianes de miR-145), SMAD7 (diana de miR-21), STAT6, JAK2 (dianes de miR-135a), per la seva participació en la regulació de la via TGF β i la proliferació tumoral; Jag1 (diana de miR-21) que afecta a la diferenciació cel·lular, i Notch1, Notch2 (dianes de miR-34a) pel seu paper clau en la diferenciació cel·lular i la inhibició de l'apoptosi.

13. A partir de les mostres de teixit humà sà, colíctic i adenomatós, l'anàlisi GO, la comparació entre els diferents grups, i la literatura, ens han permès seleccionar un llistat de gens candidats a biomarcadors de la tumorigènesi en el còlon i que també podrien estar associats a inflamació. Entre els gens candidats destaquen:

- gens que participen en la reparació del DNA: *brca1*, *brca2*, *nbn*, i *tp53*;
- gens que intervenen en la biogènesi dels miRNAs: *smad3* i *brca1*;
- gens que regulen vies de senyalització relacionades amb la inflamació: *fcer1g* intervé en la inflamació intestinal (principalment com a receptor d'IgE); *a2m* que inhibeix proteïnases i intervé en la regulació de la resposta immune; *dock2* sobre NF- κ B; *atf4* regula l'expressió de *cox-2*; i *cxcl12* sobre la quimiotaxi al tracte digestiu;

- gens que intervenen en vies de proliferació: *dock2*, *smad3*, *itga8*, *eps8*, *rhou*, i *nrp1*;
- gens que regulen processos d'angiogènesi: *ptk2b* i *nrp1*;
- gens que poden afectar a la supervivència cel·lular: *ptk2b*.

Considerem que la quantificació a gran escala de l'expressió d'aquest llistat de gens en mostres de còlon amb displàsies de diferent grau, permetria corroborar quins d'ells presenten major correlació amb la severitat de lesions i poden tenir aplicabilitat com a biomarcadors.

14.La resposta dels monòcits de pacients amb UC a lligands de TLR-4, és més marcada que l'observada en individus sans. El perfil secretor dels monòcits de pacients d'UC, pot condicionar un deteriorament més acusat de la funció barrera, propiciant una activació immunitària amb efectes amplificadors sobre la proliferació cel·lular. La hiperreactivitat de la via TLR4 en els monòcits i els macròfags de la *lamina propria* pot contribuir a la cronificació de la colitis i incrementar el risc de desenvolupar CRC.

15.En els animals del model AOM/DSS s'observa una disminució de les poblacions de cèl·lules T totals, Th i Tc, respecte als limfòcits totals, mentre que en els animals que només reben DSS s'observa un augment. Aquest canvi de tendència podria ser reflex del biaix d'una situació inflamatòria a un procés tumorigènic. L'elevada variabilitat experimental en altres poblacions cel·lulars que són molt més minoritàries ha dificultat la demostració del seu valor com a biomarcadors per al seguiment de l'evolució colitis-càncer.

16.Considerem que, tot i les limitacions en el nombre de mostres de que hem disposat en aquest estudi, l'increment de la població de cèl·lules Th17 i de monòcits en mostres de sang perifèrica de pacients amb UC en brot, tant en comparació amb els individus sans com els pacients en remissió, mostra la utilitat d'aquestes poblacions per a monitoritzar la resposta al tractament de pacients amb UC.

17.Donat que actualment els pacients de colitis reben sistemàticament tractament pal·liatiu, un estudi exhaustiu sobre el model animal emprat en aquest treball és una bona eina per identificar els mecanismes de transició inflamació-càncer sense la interferència ocasionada per la farmacoteràpia.

18.El model murí AOM/DSS també pot ser adient per contrastar el valor dels tractaments preventius de desenvolupament de CRC i per aportar informació rellevant sobre els mecanismes que intervenen.

*"After climbing a great hill,
one only finds that there are many more hills to climb."*

*("Després d'escalar una muntanya molt alta, descobreixes que hi ha moltes altres
muntanyes per escalar.")*

Nelson Mandela

